



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

1-NAPHTHYLACETAMIDE’NİN İNSAN PERİFERAL KAN
LENFOSİTLERİNDEKİ *IN VITRO* GENOTOKSİK ve SİTOTOKSİK
ETKİLERİ

Banu GÜVEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
HAZİRAN-2014



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**1-NAPHTHYLACETAMIDE’NİN İNSAN PERİFERAL KAN
LENFOSİTLERİNDEKİ *IN VITRO* GENOTOKSİK ve SİTOTOKSİK
ETKİLERİ**

Banu GÜVEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
HAZİRAN-2014**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**1-NAPHTHYLACETAMIDE’NİN İNSAN PERİFERAL KAN
LENFOSİTLERİNDEKİ IN VITRO GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK
ETKİLERİ**

**BANU GÜVEN
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Doç. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN danışmanlığında hazırlanan bu tez **12/06/2014** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN
Başkan

Prof. Dr. Deniz YILDIZ
Üye

Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER
Üye

Kod No:

Prof. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 1202 Y 0101 (281)

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

22.04.2014

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

İmza

Banu GÜVEN

ÖZET

1-NAPHTHYLACETAMIDE'NİN İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDEKİ *IN VITRO* GENOTOKSİK ve SİTOTOKSİK ETKİLERİ

Tarımda sentetik bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılan 1-naftilasetamidin insan periferal kan lenfositlerindeki genotoksik ve sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, 1-naftilasetamidin 20, 40, 80 ve 160 µg/ml'lik konsantrasyonları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. 1-naftilasetamidin genotoksik etkisi kromozom anormalliği (KA) ve sitokinez-bloklama mikronükleus (MN) testleriyle, sitotoksik etkisi de mitotik indeks (MI) ve nüklear bölünme indeksi (NBI)'nin saptanmasıyla belirlenmiştir.

1-naftilasetamid, insan periferal lenfositlerinde tüm konsantrasyonlarda (20, 40, 80 ve 160 µg/ml) ve uygulama periyodlarında (24 ve 48 saat) yapısal KA ve MN oluşumunu önemli derecede arttırmıştır. 1-naftilasetamid ile hem 24 hem de 48 saat muamele edilen kültürlerde, binükleer hücrelerdeki nüklear tomurcuk oluşumunun yüksek iki konsantrasyonda (80 ve 160 µg/ml) önemli derecede arttığı bulunmuştur. Test edilen tüm konsantrasyonlarda; 1-naftilasetamid, MI'in sadece 48 saatlik muamele süresinde, NBI'nin ise hem 24 hem de 48 saatlik muamele süresinde kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede düşmesine neden olmuştur. Bu azalmaların, her iki uygulama periyodunda konsantrasyona bağlı bir durum gösterdiği bulunmuştur.

2014, 80 Sayfa

Anahtar Kelimeler: 1-Naftilasetamid; insan periferal lenfositleri; kromozom anormalliği; mikronükleus

ABSTRACT

THE *IN VITRO* GENOTOXIC and CYTOTOXIC EFFECTS of 1-NAPHTHYLACETAMIDE on HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

In the present study, the genotoxic and cytotoxic effects of 1-naphthylacetamide, which used as synthetic plant growth regulator in agriculture, were investigated in human peripheral blood lymphocytes treated with 20, 40, 80, and 160 µg/ml of 1-naphthylacetamide for 24 and 48 hours treatment periods. The genotoxicity of 1-naphthylacetamide was investigated by studying in vitro chromosome aberrations (CAs) and cytokinesis-block micronucleus (MN) tests. Nuclear division index (NDI) and mitotic index (MI) were also calculated to determine the cytotoxicity of 1-naphthylacetamide.

1-naphthylacetamide, significantly increased the structural CAs and MN formation at all concentrations (20, 40, 80 and 160 µg/ml) and treatment periods (24 and 48 hr) in human peripheral lymphocytes. In the both 24 and 48 hr treated cultures, 1-naphthylacetamide was also found to significantly induce the nuclear bud formation in the binuclear cells, at the two higher concentrations, 80 and 160 µg/ml. At all the tested concentrations, 1-naphthylacetamide caused a statistically significant reduction in the MI only for 48 hr treatment period and also in the NDI for both 24 and 48 hr treatment periods as compared to the control groups. These decreases were found in a concentration-dependent manner during both treatment periods.

2014, 80 Pages

Key Words: 1-Naphthaleneacetamide; human peripheral blood lymphocytes; chromosome aberration; micronucleus

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN'a;

Fotoğraf çekimindeki teknik yardımlarından dolayı MKÜ Mühendislik Fakültesi İnşaat Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Selahattin KOCAMAN'a;

Tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan MKÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığına, maddi yönden destekleyen MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna (Proje No: 1202 Y 0101);

Yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans öğrenimim sırasında da benden hiçbir maddi ve manevi desteği esirgemeyen çok sevgili annem Semiha GÜVEN, babam Rafi GÜVEN ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Sentetik Oksinler ile Yapılmış Önceki Genotoksisite Çalışmaları.....	7
2.1.1. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ve Türevleri (2,4-D BEE, 2,4-D IPA, 2,4-D TIPA, 2,4-DCP) ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	7
2.1.2. 4-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	13
2.1.3. Dicamba (2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) ve Onun Ticari Formu Banvel® ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	14
2.1.4. Indole-3-acetic acid (IAA) ve β -naphthoxyacetic acid (BNOA) ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	17
2.1.5. Rastim 30 DKV ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	20
3.1.1.1. 1-Naftilasetamid.....	20
3.1.1.1.1. 1-Naftilasetamidin Özellikleri.....	20
3.1.1.1.2. 1-Naftilasetamidin Kullanım Alanları.....	21
3.1.1.1.3. İnsanların Naphthaleneacetate'lara Maruz Kalma Durumu.....	21
3.1.1.1.4. 1-Naftilasetamidin Memeliler Üzerindeki Toksik Etkileri.....	22
3.1.1.1.5. 1-Naftilasetamidin Ekotoksikolojik Etkileri.....	23
3.1.1.1.6. 1-Naftilasetamidin Çevresel Akıbeti ve Davranışı.....	24
3.1.1.1.7. 1-Naftilasetamidin Meyvede Oluşturduğu Kalıntı Miktarı.....	25
3.1.1.2. Mitomycin C (MMC) (Kyowa).....	27
3.1.1.3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma).....	27
3.1.1.4. Kromozom Medyumu.....	28
3.1.1.5. Kolşisin (Sigma).....	28
3.1.1.6. Hipotonik Eriyik.....	29
3.1.1.7. Fiksatif.....	29
3.1.1.8. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	29
3.1.1.9. Giemsa (Merck).....	30
3.1.1.10. Entellan (Merck).....	30
3.1.1.11. Nitrik Asit (HNO ₃).....	30
3.1.1.12. Cytochalasin B (Sigma).....	30
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	31
3.1.2.1. Hassas Terazî.....	31
3.1.2.2. Santrifüj.....	31

3.1.2.3. Mikroskop.....	31
3.1.2.4. İnkübatör.....	31
3.1.2.5. Flow Kabin (Steril Kabin).....	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Lamların Temizlenmesi.....	32
3.2.2. Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	32
3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	32
3.2.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....	33
3.2.2.3. Kromozom Anormalliği (KA) İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	34
3.2.2.3.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması.....	34
3.2.2.3.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	35
3.2.3. Mikronükleus (MN) ve Nüklear Tomurcuk (Ntom) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	35
3.2.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	35
3.2.3.2. Preparatların Boyanması.....	36
3.2.3.3. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	36
3.2.3.3.1. Mikronükleus (MN) ve Nüklear Tomurcuk Sayısının Saptanması.....	36
3.2.3.3.2. Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması.....	37
3.2.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekimi.....	40
3.2.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	42
4.1. 1-Naftilasetamidin Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	42
4.2. 1-Naftilasetamidin Mitoz Bölünme (MI) Üzerindeki Etkileri.....	54
4.3. 1-Naftilasetamidin Mikronükleus (MN) ve Nüklear Tomurcuk Oluşumu Üzerine Etkileri.....	56
4.4. 1-Naftilasetamidin Nükleus Bölünmesi (NBI) Üzerine Etkileri.....	67
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Bir nükleuslu hücre (X1000).....	38
Şekil 3.2.	İki nükleuslu hücre (X1000).....	39
Şekil 3.3.	Üç nükleuslu hücre (X1000).....	39
Şekil 3.4.	Dört nükleuslu hücre (X1000).....	40
Şekil 3.5.	Mikroskopta fotoğraf çekimi.....	41
Şekil 4.1.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde yapısal KA taşıyan hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	44
Şekil 4.2.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde anormal hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	45
Şekil 4.3.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde toplam KA\hücre konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı..	45
Şekil 4.4.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♂). X1000.....	46
Şekil 4.5.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (20 µg/ml 1-naftilasetamit,48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	46
Şekil 4.6.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	47
Şekil 4.7.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (20 µg/ml. 1-naftilasetamit,48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	47
Şekil 4.8.	Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (40 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	48
Şekil 4.9.	Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (80 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	48
Şekil 4.10.	Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂). X1000.....	49

Şekil 4.11.	Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂). X1000.....	49
Şekil 4.12.	Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂) X1000.....	50
Şekil 4.13.	Endoredüplikasyonlu (E) metafaz plağı (20 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	50
Şekil 4.14.	Poliploidili metafaz plağı (40 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♂). X1000.....	51
Şekil 4.15.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MI'nın konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	54
Şekil 4.16.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MI'nın konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	55
Şekil 4.17.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	58
Şekil 4.18.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	59
Şekil 4.19.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MN %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı..	59
Şekil 4.20.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (20 µg/ml 1-naftilasetamit,48 saatlik muamele, ♂). X1000.....	60
Şekil 4.21.	İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit,48 saatlik muamele, ♂). X1000.....	60
Şekil 4.22.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (40 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	61
Şekil 4.23.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu iki tane hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♂). X1000.....	61
Şekil 4.24.	İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (80 µg/ml 1-naftilasetamit,48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	62

Şekil 4.25.	İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit,24 saatlik muamele, ♂). X1000.....	62
Şekil 4.26.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	63
Şekil 4.27.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	64
Şekil 4.28.	Tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	64
Şekil 4.29.	İki tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre (80 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	65
Şekil 4.30.	İki tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂) X1000.....	65
Şekil 4.31.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde NBI'nın konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	68
Şekil 4.32.	Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde NBI'nın konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 4.1.** Değişik Konsantrasyonlarda 1-naftilasetamit ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde kromozom anormallikleri..... 43
- Çizelge 4.2.** Değişik konsantrasyonlarda 1-naftilasetamit ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre %'si, % MN, nüklear tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre %'si ve NBI.....57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

µg/l	: Mikrogram/Litre
µg/ml	: Mikrogram/Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
1 N	: 1 Normal
N	: Toplam Hücre Sayısı
µm	: Mikronmetre
r	: Regresyon
S9	: Metabolik Aktivasyon

KISALTMALAR

A→G	: Adenin→Guanin
ADI	: Acceptable Daily İntake
a.e./ha	: Acid Equivalent/Hectare
aPAD	: Chronic Population Adjusted Dose
AR	: Applied Radioactivity
ARfD	: Acut Rereference Dose
B'	: Kromatid Kırığı
B''	: Kromozom Kırığı
BGD	: Bitki Gelişim Düzenleyicisi
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicisi
BNOA	: β-Naftoksiasetik Asit
bw	: Body Weight
CA	: Chromosome Aberration
CAS	: Chemical Abstracts Service
Cat. No.	: Catalogue Numbers
CBMN-cyt	: Sitokinez-Blokloma Mikroökleus Sitom
CHO	: Chinese Hamster Ovary
Cyt-B	: Cytochalsin-B
DAR	: Draft Assessment Report
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DNA	: De(z)oksiribo Nükleik Asit
DS	: Disentrik Kromozom
EECs	: Expected Environmental Concentration
EFSA	: European Food Safety Authority
Einecs	: European Inventory of Existing Commercial Substances
ER	: Endoreduplikasyon
EPA	: Environmental Protection Agency
F	: Fragment

FAA	: Fenil Asetik Asit
FOAA	: Fenoksi Asetik Asit
Flr	: Flare
GAP	: Good Agricultural Practice
HGPRT	: Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase
HNO ₃	: Nitrik Asit
hr	: Hours
IAA	: İndol Asetik Asit
IBA	: İndol Bütirik Asit
IESTI	: International Estimated Short-Term Intake
IPCS	: International Programme on Chemical Safety
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
i.p.	: İntra Peritoneal
KA	: Kromozomal Anormallik
KCl	: Potasyum Klorür
KD	: Kromatid Değişimi
KH ₂ PO ₄	: Potassiumphosphate
KKB	: Kardeş Kromatid Birleşmesi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
LD ₅₀	: Lethaldose, Median; Dosis letalis media
LOC	: Lowest Observed Concentration
LOQ	: Limit of Quantification (Determination)
MCPA	: 4-Kloro-2-Metil Fenoksiasetik Asit
MI	: Mitotik İndeks
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronükleus
MNBN	: Mikronükleuslu Binükleer Hücre
MN-PCE	: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit
MN/hücre	: Hücre Başına Düşen Mikronükleus Sayısı
MRL	: Maximum Residue Limit or Level
mwh	: Multiple Wing Hair
NAA	: Naftalin Asetik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
Na ₂ HPO ₄	: Sodium Phosphate
NAD	: 1-Naftilasetamid
NBI	: Nükleus Bölünme İndeksi
NBUDs	: Nükleer Tomurcuk
NOAA	: Naftoksi Asetik Asit
NOAEL	: No Observed Adverse Effect Level
NPBs	: Nükleoplazmik Bridge
N _{TOMBN} %	: Nükleer Tomurcuk İçeren Binükleer Hücre Bidesi
OM	: Organic Matter Content
P	: İstatistiksel Olarak Önemlilik Derecesi
PCE	: Polikromatik Eritrosit
PI	: Proliferasyon İndeksi
Ppb	: Parts Per Billion
ppm	: Parts Per Million
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

Reg. No.	: Registration Number
RI	: Replikasyon İndeksi
rpm	: Round (rotor) Per Minute
RSM	: Rastim 30 DKV
RUD	: Residue per Unit Dose
SCD	: Sister Chromatid Differentiation
SCE	: Sister Chromatid Exchange
SCGE	: Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Testi)
SFO	: Single First-Order
SMART	: Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
TMDI	: Günlük Alınan Maksimum Teorik Miktar
Trad-MCN	: Tradescantia-Micronucleus
Trad-SHM	: Tradescantia-Stamen Hair Mutation
TRR	: Total Radioactive Residue
UDS	: Unscheduled DNA Synthesis
USEPA	: United States Environmental Protection Agency
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organisation
wi	: White-İvory
YKA	: Yapısal Kromozomal Anormallik
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit
2,4-DCP	: 2,4-Diklorofenol
2,4-D BEE	: 2,4-D 2-Butoksi Etil Ester
2,4-D IPA	: 2,4-D Isopropilamin
2,4-D TIPA	: 2,4-D Triisopropanolamin
2-Me-IAA	: 2-Metil-İndol-3-Asetik Asit
2,4,5-T	: 2,4,5-Triklorofenoksi Asetik Asit
4-CPA	: Paraklorofenoksi Asetik Asit

1. GİRİŞ

Bitki büyüme ve gelişmesini etkilediği belirlenen hem doğal ve hem de sentetik maddelere bitki büyüme düzenleyicileri (BGD) denilmektedir (Sade, 2000). Hormonlar; bitkideki büyüme ve gelişme olaylarını yönlendiren, çok düşük yoğunluklarda dahi etkili olabilen ve bitkilerde sentezlenerek taşınabilen organik maddelerdir. Bitki büyüme düzenleyicileri kavramı; bitki büyümesini etkilediği belirlenen hem doğal hem de sentetik maddeler için kullanılır. Hormon terimi ise sadece bitkilerde doğal olarak bulunanlar için kullanılmaktadır (Aydoğdu ve Boyraz, 2005).

Klasik fitohormonların oksinler, gibberelinler, sitokininler, absisik asitler ve etilenler olmak üzere beş temel grubu mevcuttur. Bu gruplara “klasik beşli” de denmektedir. Son zamanlarda, oligosakkarinler, brassinosteroidler, jasmonatlar, salisilatlar ve poliaminler gibi, bitki büyümesine ve gelişmesine, çeşitli boyutlarda etki eden bileşikler de geliştirilmiştir. Bu listenin yeni keşfedilecek BGD’ler ile büyüyeceği tahmin edilmektedir. Giderek artan çevresel kaygılar karşısında; yeni BGD’lerin araştırılması, geliştirilmesi ve tescilinin finansmanı ile ilgili zorluklar oluşmuştur (Basra, 2000).

İlk tanımlanan hormon grubu oksinlerdir. Keşfi 1880 yılında Charles Darwin ve oğlu Francis’in fototropizm konusundaki çalışmaları ile başlamış ve Went’in 1928 yılında buna yol açan maddeyi oksin olarak adlandırmasıyla tamamlanmıştır (Goodwin ve Mercer, 1983; Palavan, 1993).

Hormonların etkisinin bilimsel olarak anlaşılmasının ardından bu maddelere benzer hatta doğal olanlarından daha etkin çok sayıda madde sentetik olarak üretilmiş ve üretilmektedir (Thomas, 1981; Weichmann, 1987).

Araştırmacılar IAA (indol asetik asit) ’in doğal olarak oluşan tek oksin olduğunu belirtmişlerdir. Oksinin kimyasal yapısının aydınlatılmasından sonra, yapı olarak IAA’e az veya çok benzeyen birçok kimyasal maddenin bitkilerde oksin gibi etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. IAA dışında en yaygın bulunan oksinler; indol bütirik asit (IBA), naftalin asetik asit (NAA), naftoksi asetik asit (NOAA), fenoksi asetik asit (FOAA), 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), fenil asetik asit (FAA), parakloro fenoksi asetik asit (4-CPA) ve 2,4,5-triklorofenoksi asetik asit (2,4,5-T)’lerdir (Seçer, 1989).

Sentetik hormonlar, bitkide bulunmayan ancak bitkiye uygulandığında hormonlar gibi büyümeyi düzenleyen bileşiklerdir (Halloran ve Kasım, 2002).

Sentetik oksinlerin bitkilerdeki bazı fonksiyonları şunlardır; bitkilerde hücre bölünmesini, büyümeyi ve gelişmeyi hızlandırmak, tohum kabuğu sert olan bitkilerde tohum çimlenmesine yardımcı olmak (Seçer, 1989), adventif kök gelişimini sağlamak ve gövde segmentlerinden köklendirme yapmak, partenokarpik meyvelerin elde edilmesini sağlamak, yaprak ve meyve dökülmesini engellemek ve yabancı otların kontrolünü sağlamak (Raven ve ark., 1992; Salisbury ve Ross, 1992; Kaynak ve Ersoy, 1997; Kaynak ve Memiş, 1997; Halloran ve Kasım, 2002).

1-Naphthylacetamide (1-Naftilasetamid), doğal bir bitki büyüme düzenleyicisi olan oksin hormonu indole yapısal ve davranışsal olarak benzerlik gösteren sentetik bir bitki büyüme düzenleyicisidir (Tomlin, 2000). Yıllardır tarımda bir meyve seyreltme kimyasalı olarak ve çok sayıda meyvenin gelişimini teşvik etmek ve çelik köklendirmek için kullanılmaktadır (Gardner, 1941; Untiedt ve Blanke, 2001). Geçmişte yapılan çalışmalarda 1-naftilasetamidin çevresel koşullar altında güneş ışığı ile kendisinden daha toksik olan birincil ürüne ayrıştığı görülmüştür (Da Silva ve ark., 2013a). Bu da 1-naftilasetamidin hem insan sağlığı hem de çevre için ters etkiler yaratacağı kaygısını doğurmuştur (Da Silva ve ark., 2013b).

Dünyadaki hızlı nüfus artışına paralel olarak insanların yeterli beslenebilmesi amacıyla 1960-1970'li yıllarda tarımda "yeşil devrim" adı verilen ve tamamen üretimi artırmaya yönelik çalışmalara hız verilmiştir. Kontrolsüz endüstrileşme ile yok edilen tarım alanları ve artan besin talebini karşılamak için, üretim miktarını artırma amaçlı çeşitli yollar denenmektedir. Örnek olarak; tarımda üretimin artırılmasına yönelik bitkisel hormonların kullanılması düşünülmüştür, ancak doğal yollarla üretilen hormonların tarımda kullanımının oldukça pahalıya mal olması, daha ekonomik olarak üretilen sentetik hormonların tercih edilmesine neden olmuştur (Babaoğlu, 2002). Böylece, üretimi artırmak amacıyla sentetik kimyasal tarım ilaçları, mineral gübreler, büyümeyi düzenleyici maddeler ve hormonların kullanımı teşvik edilmiştir. Environmental Protection Agency (EPA) tarafından, büyüme düzenleyiciler: Böcek veya bitkilerin büyümelerini geciktiren veya hızlandıran kimyasallar olarak tanımlanmış ve pestisitler kategorisinde sınıflandırılmıştır (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Bu maddeler sıvı formda püskürtme veya daldırma ya da gaz halde bitkilere uygulanmaktadır. Yaprakları pürüzsüz bitkilere sıvı formda yapılan uygulamalarda büyüme düzenleyici maddenin içine yapıştırıcı madde ilavesi yapılabilmektedir (Palavan, 1993).

Türkiye’de sentetik büyüme düzenleyicileri özellikle kış aylarında tüketilen ve hemen hemen tamamı Akdeniz Bölgesi’nde üretilen sera ürünlerinde uygulanmaktadır. Yine, Türkiye’de kullanılan zirai mücadele ilaçlarının toplamının %40’a yakını bu bölgede kullanılmaktadır (Babaoğlu, 2002).

Eser (1986), Türkiye’de BGD kullanımının değerlendirilmesine yönelik yapmış olduğu çalışmada, sebze üreticilerinin % 96’sının hormon kullandığını bildirmiştir. Mansuroğlu ve ark. (2005) tarafından Hatay ilinde yapılan bir çalışmada ise, çiftçilerin hormon kullanıp kullanmadıkları sorusuna verdikleri yanıtlardan elde edilen sonuçlara göre, Hatay ili genelinde % 53.6 oranında hormon kullanıldığı belirlenmiştir. Bazı çiftçiler aşırı hormon kullandıklarını anket çalışmasında belirtmemişlerdir. Ancak, bitki ve meyveler üzerinde yapılan incelemelerden hormon kullanımının ankette belirtilen kullanım değerinin oldukça üzerinde olduğu belirlenmiştir. Aynı anket çalışmasında seracıların % 32.3’ü hormon hakkında bilgisi olmadığını belirtirken, % 20.4’ü hormon kullanımının tehlikeli olmadığını, % 47.3’ü ise tehlikeli olabileceğini belirtmiştir. Anket çalışmaları sadece bu maddelerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımlarını tespit etmek için değil, aynı zamanda hormon ve zirai ilaç uygulayıcılarının kendi sağlıklarına verdikleri önemi belirlemeye yönelik de uygulanmıştır. Mansuroğlu ve ark. (2005) yapmış oldukları anket çalışması neticesinde kullanıcıların kendi sağlıklarını korumaya yönelik önlem olarak eldiven ve maske kullanıp kullanmadıkları araştırılmıştır. Eldiven kullanıp kullanmadıkları sorusuna bireyler tarafından % 53.3 oranında eldiven kullanmadıkları belirtilmiştir. Maske kullanımında ise il genelinde çiftçilerin % 71.6 oranında maske kullanmadıkları tespit edilmiştir.

Tarımsal üretimi artırma durumundaki ülkeler, bitki büyüme hormonlarının yanında bazı pestisit ve herbisitleri de yoğun olarak kullanmaktadırlar. Tüm bu kimyasalların kullanımı aynı zamanda çevre kirliliğine de sebep olmaktadır. Bu maddelerin yarılanma ömürleri uzun olup, toprakta, sebze ve meyveler üzerinde kalmakta ve besin zinciri ile de insana kadar ulaşmaktadır. Üretimde miktar ve kaliteyi arttırmak amacıyla tarımda kullanımı teşvik edilen, sentetik kimyasalların ve BGD’lerin

kontROLSÜZ ve bilinçsiz bir şekilde aşırı miktarlarda kullanımı neticesinde ürünlerde oluşan kalıntılar insan ve çevre sağlığı üzerinde çeşitli toksik etkilere de neden olmaktadır. Özellikle BGD'ler canlı sistemden tamamen atılmayıp organlarda depolanmakta ve fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Yılmaz ve Yüksel, 2002). Bu nedenle, bu maddelerin canlılar üzerinde genotoksik etkileri olup olmadığını belirlemek önemlidir.

Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Choy, 2001; Young, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Vural, 2005).

Genetik toksisite ya da genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploid gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır (Choy, 2001; Young, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Zeiger, 2004).

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar ya da mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoriyel hastalıklara yol açmaktadır (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Mateuca ve ark., 2006).

Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş ve insanlar için karsinojen olan pek çok bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğunun gösterilmesi, genotoksisite testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur (Purchase, 1978; Mavournin, 1990; Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005).

Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir (Bedir ve ark., 2004). Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar (Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005). Genotoksisite testleri ile mutajenlerin tanımlanması, insanda risk tayininin yapılması ve bu maddelere gereksiz maruziyetin önlenmesi genetik toksikolojinin başlıca amaçlarını oluşturmaktadır. Genellikle kısa dönem mutajenite testleri tarama amaçlı kullanılırken, memeli testleri ise insanda risk tayini için kullanılmaktadır (Vural, 2005).

Genotoksisite testleri esas olarak genomu etkileyebilecek ultraviyole radyasyon gibi fiziksel etkenlerin, parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateryaller gibi birçok kimyasal ajanın genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların hem piyasaya sürülmeden önce hem de ilaç kullanan kişilerdeki genetik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarının tespitinde, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kanserden korunmada, kansere duyarlılığın tayininde ve takibinin yapılmasında biyoizlem testleri olarak kullanılmaktadır (Preston, 1981; Choy, 2001; Jena, 2002; Mateuca ve ark., 2006).

Bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında tek bir testin tek başına yeterli olmadığı, bu nedenle bileşiklerin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (Zeiger ve ark., 1990; Albertini ve ark., 2000; Choy, 2001; Mortelmans ve Rupa, 2004; Olaharski ve ark., 2006).

Genetik sistemler ile genotoksisitesi test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri; Ames testi, Comet testi, Kromozom anormalliği (KA) testi, Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Kromozom anormallikleri (KA) DNA düzeyindeki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomlar ise DNA'daki zincir kırıklarının yanlış

onarılmasından kaynaklanmaktadır. Genetik materyalde oluşan bu tip hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek KA frekansı ise, artmış kanser riskini göstermektedir (Anderson, 1988; Carrano ve Natarajan, 1988; Savage, 1993; Albertini ve ark., 2000; Norppa ve ark., 2006).

KA testi, mutajenler tarafından indüklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılan standart bir yöntemdir. *In vitro* KA testi ile memeli hücre kültürlerinde, *in vivo* KA testi ile genellikle sıçan kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliği frekansı değerlendirilebilmektedir. Ayrıca *in vivo* KA testi, özellikle mutajenik hasarın belirlenmesinde türe ve dokuya göre değişebilen metabolizma, farmakokinetik ve DNA onarım mekanizmaları gibi faktörlerin değerlendirilmesine de olanak sağlamaktadır (Preston ve ark., 1981; Evans, 1984; Preston ve ark., 1987; Choy, 2001).

Mikronükleuslar (MN) genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan insanlarda, kanser ve genomik düzensizlik ile karakterize edilen çeşitli hastalıklarda MN frekansının önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (Vanparys ve ark., 1990; Stoper ve Müller, 1997; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002; Karaman ve Keskinler, 2009). MN testi, mitoz ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir test haline gelmiştir (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Stoper ve Müller, 1997).

Bu çalışmanın amacı oksinler grubuna dahil edilen bir sentetik bitki büyüme düzenleyicisi olan 1-naftilasetamidin insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olup olmadığını *in vitro* KA ve MN testleri ile araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sentetik Oksinler ile Yapılmış Önceki Genotoksisite Çalışmaları

2.1.1. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ve Türevleri (2,4-D BEE, 2,4-D IPA, 2,4-D TIPA, 2,4-DCP) ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)'nin muhtemel mutajenik etkisi Salmonella/mikrozom test sistemiyle araştırılmıştır (Uysal ve ark., 2010). Test maddesinin toksik-olmayan konsantrasyonları (100, 50, 10,1 ve 0.1 µg/petri) *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşlarında metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda revertantların sayısını kontrole göre arttırmamıştır. Bu nedenle, araştırmacılar, 2,4-D'nin Salmonella/mikrozom test sistemine göre mutajenik ya da promutajenik olmadığını bildirmişlerdir.

Cenkci ve ark. (2010) tarafından, fasulye fidesi (*Phaseolus vulgaris* L.) köklerinde 2,4-D'nin genotoksik potansiyeli araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından, iki günlük etiole edilmiş fideler 0.1, 0.2, 0.3 ppm'lik 2,4-D ile muamele edilmiş ve 96 saatlik çimlendirme periyodu sonunda, kök gelişimi, toplam çözümlü protein içeriği, bireysel hücrelerdeki DNA hasarı (komet analizi skorları), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA profilleri (RAPD), genotoksisitenin belirleyicileri olarak kullanılmıştır. Araştırmacılara göre, çalışmada 2,4-D'nin açık bir şekilde konsantrasyona bağlı kök gelişimi inhibitörü olduğu ortaya çıkmış ve çözümlü protein içeriği yalnızca 0.3 ppm'lik ($P<0.05$) 2,4-D'de belirgin bir şekilde artmıştır. Ayrıca araştırmacılar, komet analizinden elde ettikleri verilere göre, 2,4-D'nin etkisiyle meydana gelen DNA fragmentasyonunun konsantrasyona bağlı bir şekilde artış gösterdiği ve ortaya çıkan ve/veya kaybolan RAPD bantlarının diagnostik ve fenetik analizlerinin ise 2,4-D'nin neden olduğu konsantrasyona bağlı DNA polimorfizmi gösterdiğini bildirmişler ve genomik modelin kararlılığının test edilen tüm 2,4-D konsantrasyonlarında önemli şekilde etkilendiğini belirtmişlerdir.

2,4-D'nin sitotoksik etkileri HepG2 hücrelerinde araştırılmıştır. Sonuç olarak 2,4-D hücre döngüsüne konsantrasyona bağımlı bir tutum içerisinde etki etmiştir. Bu araştırma gösteriyor ki 2,4-D sitotoksik etkisini mitokondriyal membran potansiyelinde

doğrudan bir etki gösterip apoptosize neden olarak ortaya koymaktadır (Tuschl ve Schwab, 2003).

2,4-D'nin genotoksik etkisi, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde homolog rekombinasyon ve nokta mutasyon markırlarına bakılarak çalışılmıştır. Araştırmacılar, düşük konsantrasyonlarda (3-100 µg/l) 2,4-D içeren sıvı besi ortamında 28 gün boyunca büyütülen *Arabidopsis* bitkilerinde homolog rekombinasyon (dolayısıyla DNA çift iplik kırığı) frekansı ve A→G nokta mutasyonu frekansında kontrole göre önemli derecede artış olduğunu bildirmişlerdir (Filkowski ve ark., 2003).

Holland ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada, hücreler tam kan ya da izole lenfosit olarak kültür edilip, 0.001-1 mM arasındaki konsantrasyonlardaki 2,4-D'nin saf ya da ticari formları ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Araştırmacılar, saf haldeki 2,4-D'ye maruz kalan tam kan hücrelerinin MN'unda minimal bir artış, izole lenfosit kültürlerinde de bu artışın biraz daha az miktarı meydana geldiğini ve bu indüksiyonun yalnızca sitotoksositeye yakın olan seviyelerde gerçekleşmiş olup, buna önemli derecede replikatif indeks (RI) inhibisyonunun eşlik ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, ticari amaçla kullanılan 2,4-D'nin düşük dozlarından birinde (0.005 mM), birbirinden bağımsız yapılan iki deneyin de RI'larında (12–15%) önemli olarak kabul edilebilecek çok küçük bir artış bulunduğunu ($P=0.052$); ayrıca, izole lenfosit kültürlerinde, ticari formülasyondaki 2,4-D'nin eşit konsantrasyonlardaki saf 2,4-D'ye göre RI'yı daha fazla etkilediği fakat MI değerleri bakımından önemli bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, 3 ay boyunca yalnızca 2,4-D'ye maruz kalmış 12 erkek uygulayıcının lenfositlerinde belirlenen RI'nın aynı grubun maruziyet öncesi halinden ve kontrol grubundan önemli derecede yüksek olduğu bildirilmiştir.

Allium cepa kök ucu testi ile 2,4-D'nin klastojenik etkisi araştırıldığında 2,4-D'nin en yüksek konsantrasyonlarda (5-20 ppm) açık bir şekilde morfolojik değişimlere yol açtığı görülmüştür. MI'nın ortalama % 14.32 ile kontrol değerinden düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, 2,4-D'nin kontrole kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli derecede kromozom aberasyonlarına yol açtığı bildirilmiştir (Ateeq ve ark., 2002).

2,4-D ve onun metaboliti 2,4-diklorofenol (2,4-DCP)'un sitogenetik etkileri fare kemik iliği, üreme hücreleri ve sperm başındaki anormalliklerde araştırılmıştır. İsviçre'ye özgü fareler oral besleme yoluyla 1.7, 3.3 ve 33 mg kg⁻¹ bw konsantrasyonlarda (1\200, 1\100 ve 1\10 LD₅₀) 2,4-D ile muamele edilmişlerdir. 2,4-

DCP ise farelere intraperitoneal olarak (i.p.) 36, 72 ve 180 mg kg⁻¹ bw'lik (1\10, 1\5, 1\2 LD₅₀) enjekte edilmiştir. 2,4-D' nin 3.3 mg kg⁻¹ bw konsantrasyonunun ard arda 3 ve 5 günlük oral uygulamasından sonra kemik iliği ve spermatozoid hücrelerinin kromozom aberasyonları yüzdesinde önemli bir artış gözlenmiştir. 2,4-D, sperm başı anormalliklerinin yüzdesinde de konsantrasyona-bağlı bir artışa neden olmuştur. 2,4-DCP'nin genotoksik etkisi 2,4-D'den daha düşük bulunmuş ve 2,4-DCP'nin kromozom aberasyonları (kemik iliği ve spermatozoid hücrelerinde) ve sperm başı anormalliklerini daha düşük bir yüzde ile indüke ettiği belirtilmiştir. 2,4-DCP'nin i.p. enjeksiyonundan sonra yalnızca test edilen en yüksek konsantrasyonunda (180 mg kg⁻¹ bw, 1\2 LD₅₀) kromozom ve sperm başı anormalliklerinin yüzdesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Araştırmacılar, çalışmalarından elde ettikleri sonuçlara göre; 2,4-D'nin test edilen şartlar altında in vivo olarak farelerde genotoksik olduğunu; bu nedenle, 2,4-D'nin yemeklik mahsullerde kullanımında daha dikkatli olunması gerektiğini ve tekrarlı kullanımlarının sağlık açısından tehlike oluşturabileceğini bildirmişlerdir (Amer ve Aly Fawzia, 2001).

Madrigal-Bujaidar ve ark. (2001) tarafından, saf haldeki 2,4-D'nin değişik konsantrasyonları (50, 100 ve 200 mg/kg) ile muamele edilmiş (ağızdan verilerek) farelerin sperm ve kemik iliği hücrelerindeki KKD frekansı incelenmiştir. 2,4-D'nin yüksek iki konsantrasyonu ile muamele edilen farelerin somatik hücrelerinde, KKD frekansının konsantrasyona-bağlı olarak önemli derecede artış gösterdiği, fakat mitotik indeks ve hücre proliferasyon kinetiği açısından bakıldığında 2,4-D'nin herhangi bir modifikasyona yol açmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, üreme hücrelerinde de 2,4-D'nin test edilen en yüksek iki konsantrasyonunda KKD frekansında kontrole göre önemli bir artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar tarafından, yüksek konsantrasyonlardaki 2,4-D'nin in vivo fare muamelelerinde orta dereceli bir genotoksikan olduğu ve mevcut koşullarda kullanımının insanlar için az da olsa bir tehlike oluşturabileceği bildirilmiştir.

2,4-D ve türevleri yaygın olarak geniş yapraklıların ve odunsu bitkilerin kontrolü için kullanılan herbisitler olup bu kimyasalın bir esterinin (2,4-D 2-butoxyethylester) ve iki tuzunun (2,4-D isopropylamine ve 2,4-D triisopropanolamine) genetik toksisitesi kültüre edilmiş memeli hücrelerinde araştırılmıştır. Araştırmacılar çalışmalarında, kültüre edilmiş sıçan lenfositlerindeki kromozom anormalliği ve Chinese hamster yumurta

hücrelerinin HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) lokusundaki ileri mutasyon testlerini kullanmışlardır. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre; metabolik aktivasyon (S9) yokluğundaki in vitro kromozom aberasyonları analizinde 2,4-D 2-butoxyethylester (2,4-D BEE)'nin 1400 µg/ml'ye kadarki tüm konsantrasyonlarda klastojenik bir etkiyi indüke etmediği; benzer biçimde, S9 varlığında 700 µg/ml' lik konsantrasyona kadarki hücre muamelelerinde de anormal hücre frekansında belirgin bir artışa neden olmadığı belirlenmiştir. CHO/HGPRT analizinde ise, hem metabolik aktivasyon sisteminin varlığında hem de yokluğunda 2,4-D BEE ile muamele edilmiş kültürler negatif kontrol değerleri ile kıyaslandığında ikisinin mutant frekansları arasında belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür. Araştırmacılar tarafından, kromozom aberasyonları analizinde 2,4-D isopropylamine (2,4-D IPA) ve 2,4-D triisopropanolamine (2,4-D TIPA)'nın S9 varlığında ve yokluğunda yapılan analizlerde, anormal hücre frekansında kontrole göre önemli bir artış meydana getirmediği ve CHO hücrelerinde de HGPRT mutasyon frekansında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmadıkları bildirilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar tarafından, çalışmalarında kullandıkları testlerde, 2,4-D ve türevlerinin genotoksik etki göstermedikleri rapor edilmiştir (Gollapudi ve ark., 1999).

Kaya ve ark. (1999), 2,4-D'nin genotoksik değerlendirmesini *Drosophila melanogaster*'de kanat spot test ile rapor etmişlerdir. Kanat trikomalrı, multiple kanat tüyleri (mwh), ve flare (flr)'nin gen ifadesini etkileyen iki resesif mutasyon için üç trans-heterozigot instar larva 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarına kronik besleme yoluyla maruz bırakılmışlardır. Besleme hali, canlı larvaların pupa evresine ve erginlerde mwh, flr, veya mwh-flr fenotipleri ile wing-blade hücre klonlarının meydana çıkması için uyarılan genotoksik etkilerin gözlenebilmesine kadar devam etmiştir. Heterozigot sineklerde *mwh/flr* işaretleyicisi kullanılarak yapılan kanat spot analizi ile 2,4'nin rekombinasyon ve somatik mutasyonu tetikleme kapasitesi ölçülmüştür. Sonuçlara göre; araştırmacılar, yalnızca 10 mM'lik konsantrasyondaki 2,4-D'nin toplam spot frekansında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olduğunu, fakat *mwh/TM3* inversiyon heterozigot sineklerle elde edilen verilere göre kanat spot frekanslarından hiçbirinde belirgin bir artış görülmediğini bildirmişler ve bu nedenle 2,4-D'nin bu test sitesinde zayıf genotoksik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Charles ve ark. (1999a) tarafından, 2,4-D ve onun yedi tuz ve esterinin in vitro genetik toksisitesi bakterilerde gen mutasyonu (Ames test) ve rat hepatositlerinde DNA hasar ve tamirinin indüklenmesi yoluyla incelenmiş, ayrıca 2,4-D'de in vivo programlanmamış DNA sentezi (UDS) analizi uygulanmıştır. Araştırmacılar, bu analizlerde 2,4-D asidi ve hiçbir türevinin genotoksik potansiyeli olmadığını bildirmişlerdir.

2,4-D ve onun yedi farklı tuz ve esterinin memeli hücrelerinde in vivo sitogenetik anormalliklere neden olup olmadığı fare kemik iliğinde mikronükleus (MN) testi ile araştırılmıştır. Bütün test maddeleri dişi ve erkek farelere oral besleme yoluyla uygulanmış ve fare kemik iliğindeki mikronükleuslu polikromatik eritrosit (MN-PCE) frekansı 24, 48 ve 72 saatlik doz takibi aralıklarıyla belirlenmiştir. Sonuç olarak; araştırmacılar tarafından, hiçbir test maddesinin test edilen hiçbir konsantrasyonunda, fare kemik iliği hücrelerinde MN-PCE frekansında bir artışa neden olmadığı rapor edilmiştir (Charles ve ark., 1999b).

2,4-D'nin genotoksik potansiyeli, *Drosophila melanogaster*'de paralel olarak yapılan farklı iki somatik genotoksikite analizi; kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (Smart) ile white-ivory (wi) göz spot testleri ile test edilmişlerdir. İki veya üç günlük larvalar kronik bir şekilde 2,4-D ile beslenmişlerdir. Çalışma sonunda araştırmacılar tarafından; 2,4-D'nin, mitotik rekombinasyondan kaynaklanan genotoksik aktivite yüzdesinin % 68 olduğu ve white-ivory göz spot testte, 2,4-D'nin yüksek rekombinojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Graf ve Würzler, 1996).

Pavlica ve ark. (1991) tarafından, sentetik oksin 2,4-D'nin sitotoksik ve mutajenik etkileri soğan kök ucu hücreleri ile V79 Chinese hamster fibroblast hücrelerinde çalışılmış ve karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, 2,4-D'nin, soğan kök ucu hücrelerinde kromatin ve kromozom yapısında ve hücre döngüsü süresinde değişikliklere yol açtığını, mitotik aktivitede değişikliklere neden olduğunu ve sonuç olarak 10 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyon aralıklarında mutajenik aktivite gösterdiğini; test maddesinin V79 hücre kültürlerinde de 10 µg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda mutajenik ve sitotoksik etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir.

Fenoksiasetik asit herbisitlerinin etkileri insan periferik lenfosit kültürlerinde in vitro ve maruz kalmış işçi lenfositlerinde *in vivo* olarak kromozom anormalliği testi ile araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından, Saf 2,4-D'nin çalışılan tüm konsantrasyonlarda

(0.125, 0.150, 0.200 ve 0.350 mM) kontrole göre anormallik sayısını arttırmazken; 2,4-D'nin ticari formunun (0.125, 0.250, 0.500, 1.000 ve 1.250 mM, fenoksiasetik asit konsantrasyonlarında) *in vitro* kromozom anormallikleri sayısında önemli bir artışa yol açtığı (dış metabolik aktivasyon sistemi olmadan) bildirilmiştir. Çalışmada, işçilerin nefes alma zonunda fenoksi asit seviyelerinin 0.3 ve 0.4 mg/m³ arasında değişmiş olup maruziyet sonrası işçilerin idrarlarındaki fenoksiasetik asit konsantrasyonlarının da 0.000 dan 0.055 mmol/l ye kadar değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, araştırmacılar, 2,4-D'ye maruz kalan tarım işçilerinin periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonlarında herhangi bir artış olmadığını bildirmişlerdir (Mustonen ve ark., 1986).

Turkula ve Jalal (1985) tarafından yapılan çalışmada, 2,4-D'nin mutajenik etkisi kültüre edilmiş insan lenfositlerinde KKD testi ile belirlenmiştir. Araştırmacılar, 50 µg/ml konsantrasyondaki 2,4-D uygulamasının insan lenfositlerinde KKD frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığını; 100 ve 250 µg/ml'lik konsantrasyonlarda ise KKD frekansında belirgin fakat önemli olmayan bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar, çalışmalarından elde ettikleri sonuçlara göre, 2,4-D'nin ticari örneklerine doğrudan maruziyet sonucu oluşabilecek genetik hasar tehlikesinin göz ardı edilmemesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Linnainmaa (1984), 2,4-D ve 4-kloro-2-metilfenoksiasetik asit (MCPA)'nın genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, bu maddelere ayrı ayrı maruz bırakılmış (2 hafta boyunca, mide içine, 100 mg/kg doz/gün) sıçanların kan lenfositlerinde ve aynı süre ve konsantrasyondaki 2,4-D ve MCPA ile ayrı ayrı muamele edilmiş Chinese hamster kemik iliği hücrelerinde KKD frekansının kontrole göre önemli derecede artmadığını; ayrıca test maddelerinin ticari formüllerinin yanı sıra saf haldeki 2,4-D ve MCPA ile *in vitro* olarak muamele edilen Chinese hamster yumurta hücrelerinde (CHO) (10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³M, 1 saat için), rat karaciğer mikrozomal aktivasyon sistemi S9 varlığında ve yokluğunda, KKD frekansında kontrole göre önemli olmayan küçük bir artış meydana geldiğini ve saf haldeki fenoksi asetik asitler ile ticari formülleri arasında KKD frekansını indüklemeleri bakımından herhangi bir farklılık bulunmadığını bildirmiştir. Araştırmacı tarafından, yaptığı çalışmanın sonuçlarına dayanarak, 2,4-D ve MCPA'nın doğrudan DNA'da hasar yaratan ajanlar olarak etki göstermedikleri belirtilmiştir.

Korte ve Jalal (1982) tarafından, 2,4-D'nin mutajenik ve klastojenik potansiyelini belirlemek için kültüre edilmiş insan lenfositlerde kardeş kromatid değişimi (KKD) testi yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre; araştırmacılar, insan lenfositlerine 0.2 µg/ml kadar düşük bir konsantrasyonda 2,4-D uygulanmasının bile istatistiksel olarak önemli olmasa da kromozom hasarı meydana getirdiğini; fakat 2,4-D'nin 50 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanması ile meydana gelen kromozom hasarının kontrole göre istatistiksel olarak önemli derece artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, ayrıca, KKD frekansındaki artış oranı temel alınarak mutajenitenin 10 µg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda önemli olduğu belirtilmiştir.

2.1.2. 4-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

4-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA)'nın, Salmonella/mikrozom test sistemine göre, *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşlarında metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda 10-200 µg/petri konsantrasyonları arasında mutajenik/promutajenik etkisi bulunmamıştır (Uysal ve ark., 2010).

Özellikle Akdeniz bölgesinde domatesin gelişmesi için bitki hormonu olarak yaygın bir şekilde kullanılan 4-CPA'nın genotoksisitesini belirlemek için insan lenfosit kültüründe KKD testi kullanılmıştır. Araştırmacılar, yaptıkları bu çalışma sonucunda 4-CPA'nın test konsantrasyonları ile normal kontrol arasında belirgin bir farklılığa rastlanılmadığını bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca, yaş ve cinsiyetin KKD frekansındaki olası etkileri de test edilmiş fakat KKD ile cinsiyet ve yaş arasında bir bağlantı olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, sonuç olarak, 4-CPA'nın üç farklı konsantrasyonu (10, 15 ve 20 µg/ml) ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde genotoksisite gözlenmediğini rapor etmişlerdir (Bağcı ve ark., 2005).

4-CPA'nın genotoksisitesi *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon olaylarını belirleyen kanat spot test kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada, kanat trikomları, multiple kanat tüyleri (mwh), ve flare (flr)'nin gen ifadesini etkileyen iki resesif mutasyon için üç trans-heterozigot instar larva bu kimyasalın farklı konsantrasyonlarına kronik besleme yoluyla maruz bırakılmış ve besleme hali, canlı larvaların pupa evresine ve erginlerde mwh, flr, veya mwh-flr

fenotipleri ile wing-blade hücre klonlarının meydana çıkması için uyarılan genotoksik etkilerin gözlenebilmesine kadar devam etmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar 4-CPA'nın, spot frekansında herhangi bir önemli artışa neden olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, mwh ve multiple inverted TM3dengeleyici kromozomu için heterozigot olan larvalar da, bu kimyasal ile muamele edildiğinde, kanat spot frekansında herhangi bir artış belirlenmemiştir. Böylece araştırmacılar, 4-CPA'nın *Drosophila melanogaster*'de yapılan kanat spot analizine göre genotoksik etki göstermediğini rapor etmişlerdir (Kaya ve ark., 1999).

2.1.3. Dicamba (2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) ve Onun Ticari Formu Banvel® ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

González ve ark. (2011) tarafından, dicamba ve banvel®'in sitotoksik ve genotoksik etkileri sitokinez-blokloma mikroukleus sitom (CBMN-cyt) testi ile nükleus bölünme indeksi (NBI), mikronükleus frekansı (MN), nükleoplazmik köprü (NPBs) ve nüklear tomurcuk (NBUDs) analizleri hesaplanarak tekrar araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, araştırmacılar tarafından, MN indüklemeye mekanizmasını belirlemek için CREST anti-kinetokor antikoru analizi uygulanmıştır. Çalışmada, her iki bileşiğin de aktivitesi Chinese hamster yumurta hücrelerinde (CHO-K1) 50-500 µg/ml'lik konsantrasyon aralıklarında test edilmiştir. Sonuçlara göre: Hem dicamba hem de banvel® NBI'da konsantrasyona bağlı bir düşüşe yol açmıştır ancak istatistiksel olarak önemli sayılabilecek tepki yalnızca banvel®'in 100-500 µg/ml'lik konsantrasyon aralığıyla muamele edilmiş kültürlerde meydana gelmiştir. MN'un konsantrasyona bağlı artışı dicamba ve banvel® ile sırasıyla 50-400 µg/ml ve 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığındaki muamelelerden sonra gözlemlenmiştir. NPBs ve NBUDs indüksiyonları her iki test bileşiğinin etkisiyle önemli derecede artış göstermiştir. NPBs\MN oranındaki değerler, dicamba ve banvel® için sırasıyla 0.04-0.11 ve 0.05-0.18 olarak bulunmuştur. Araştırmacılara göre, elde ettikleri sonuçlar, açık bir şekilde dicamba ve banvel®'in CHO-K1 hücrelerinde hem sito- hem de genotoksik hasara yol açtığını kanıtlamaktadır. Araştırmacılar, ayrıca, CBMN-cyt analiz çalışması ile dicamba tarafından uyarılan MN oluşumlarının hem klastojenik hem de anojenik mekanizmalardan kaynaklandığını

belirlemişler ve bunun önceki araştırmalarında belirttikleri, dicambanın hücrel ve DNA hasarı meydana getirme kapasitesiyle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Dicambanın genotoksik potansiyeli *Phaseolus vulgaris* L. köklerinde komet ve RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) analizleriyle çalışılmıştır. İki günlük etiole edilmiş fideler, 0.1, 0.2, 0.3 ppm konsantrasyonlarındaki dicamba ile muamele edilerek 96 saat çimlendirilmiştir. Araştırmacılar tarafından, dicambanın konsantrasyona-bağlı olarak kök gelişimini inhibe ettiği ve toplam çözünür protein içeriğinin dicambanın yüksek konsantrasyonlarında (0.2 ve 0.3 ppm) belirgin bir şekilde düşüş gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, dicambanın fasülye köklerine 96 saat uygulanması sonucu meydana gelen DNA fragmentasyonunun konsantrasyona bağımlı bir tutum içinde artış gösterdiğini, RAPD analizinde ise test maddesinin yine konsantrasyona bağlı olarak DNA polimorfizmini indüklediğini bildirmişlerdir. Ayrıca, genomik modelin kararlılığının test edilen tüm dicamba konsantrasyonlarından önemli şekilde etkilendiği rapor edilmiştir (Cenkci ve ark., 2010).

Benzoik herbisit dicambanın ve onun Arjantine özgü ticari formu banvel® 'in (% 57.71 dicamba) sitogenetik ve genotoksik etkisini ve bu etkinin oksidatif hasar yoluyla olup olmadığını belirlemek için CHO hücrelerinde in vitro KKD testi uygulanmış; aynı çalışmada ayrıca E vitamininin koruyucu rolü çalışılmıştır. Hücreler, test bileşikleriyle ya 24 saat (protokol A) ya da 12 saat (protokol B) muamele edilmiştir. Protokol A; E vitamininin, dicamba tarafından uyarılan KKD frekansını azalttığını, hücre döngüsü gecikmesini düzelttiğini ve sadece 500 µg/ml dicamba ile muamele edilen kültürlerde kısmen hücre ölümünü engellediğini göstermiştir. Benzer bir eğilim banvel® ile muamele edilen kültürlerde de bulunmuştur. Protokol B; E vitamininin, yalnızca dicambanın indüklediği geno-ve sitotoksik etkiler için benzer bir koruyucu rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar, bu gözlemlere dayanıldığında, dicambanın diğer türdeki mekanizmalardan daha ziyade, reaktif oksijen türleri ile DNA'ya zarar verdiği fikrinin ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, banvel®'in, dicamba tarafından gözlenen etkileri taklit etmesine rağmen, formülasyonunun DNA hasarını indüke edebilen diğer ksenobiyotik ajanları içermiş olmasından dolayı farklı bir mekanizma/lar ile hücrel ve DNA hasarını uyurabileceğini ileri sürmüşler; ayrıca, dicamba ve banvel®'in ortaya koyduğu toksik etkilerin olası mekanizmaları ile ilgili

kapsamlı bilgi elde etmek için daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir (González ve ark., 2009).

Dicamba ve onun bir ticari formu olan banvel[®] (dicamba % 57.71)'in geno- ve sitotoksik etkileri, Chinese hamster yumurta hücrelerinde (CHO) KKD frekansı, hücre döngüsü gelişimi analizi ve tek hücre jel elektroforez tekniği (SCGE, comet analizi) kullanılarak araştırılmıştır. Log-faz hücreleri 1.0-500 µg/ml herbisit ile muamele edilmiş ve KKD ve hücre döngüsü gelişimi analizi için 24 saat kültür edilmişlerdir. Her iki test bileşiminin değerlendirilmiş tüm konsantrasyonları kontrol değerinin üzerinde yüksek bir KKD frekansına neden olmuş fakat bu artış konsantrasyona bağlı bulunmamıştır. 200 ve 500 µg/ml'lik dicamba dozları ve 500 µg/ml'lik banvel[®] dozu için, hücre döngüsü gelişiminde önemli bir gecikme bulunmuştur. Regresyon testi, kültür tüpleri içine 1.0-500 µg/ml konsantrasyon aralığında ilave edilmiş gerek dicamba ($r = - 0.98$, $P < 0.05$) gerekse banvel[®] ($r = - 0.88$, $P < 0.01$) konsantrasyonlarının fonksiyonları kadar proliferasyon indeks oranının azaldığını göstermiştir. 50 ve 500 µg/ml konsantrasyon aralığındaki dicamba ve banvel[®] ile 90 dakika muamele edilmiş CHO hücrelerinde SCGE uygulanmış ve her iki test maddesi tarafından indüklenen DNA hasarında açık bir şekilde artış görülmüştür. Dicamba, tüm konsantrasyonlarda hem comet uzunluğunda hem de genişliğinde kontrol değerlerinin üzerinde ($P < 0.01$) önemli derecede bir artışa neden olurken banvel[®] aynı etkiyi yalnızca 100-500 µg/ml'lik konsantrasyon aralığında göstermiştir ($P < 0.01$). Bu çalışma sonunda, araştırıcılar tarafından, çok duyarlı üç biyoanalizin sonuçlarına göre, dicamba ve banvel[®] 'in CHO hücrelerinde DNA ve hücre hasarını oluşturabilme kapasitesini açık bir şekilde gösterdiği bildirilmiştir (González ve ark., 2007).

Fenoksi herbisit Dicamba ve onun ticari formu banvel (%57.71 dicamba)'in sitogenotik etkileri *in vitro* tam kan insan lenfosit kültürlerinde çalışılmıştır. Herbisitlerin genotoksiteleri KKD frekans analizi ve hücre döngüsü işleyişi analizleri ile ölçülmüştür. Sadece 200 µg/ml'lik dicamba ve 500 µg/ml'lik banvel konsantrasyonları KKD frekansında kontrol değerlerinin üzerinde belirgin bir artışa neden olmuştur. Dicambanın test edilmiş en yüksek dozu (500 µg/ml) hücre kültürü sitotoksitesine yol açmıştır. Hücre döngüsü kinetiği test bileşiklerinin her ikisinden etkilenmiş ve hücre döngüsü işleyişinde belirgin bir gecikme saptanmıştır. 100 ve 200 µg/ml'lik dicamba ve 200 ve 500 µg/ml'lik banvel muamelelerinden sonra proliferatif

indeks oranında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Her iki kimyasalın da kültürlerin mitotik aktivitesinde aşamalı bir doz-ilişkili inhibisyona neden oldukları gözlenmiştir. Dahası, her iki kimyasalın 100 µg/ml üzerindeki dozları kullanıldığında yalnızca mitotik aktivitede istatistiksel olarak kontrol değerlerine göre farklılıklar görülmüştür. Bu sonuçlara dayanıldığında, araştırmacılar tarafından, dicamba'nın DNA'da hasar yaratan kimyasal bir ajan ve insanlar için potansiyel zarar yaratan bir bileşik olabileceği bildirilmiştir (González ve ark., 2006).

Filkowski ve ark. (2003), 120 µg/l konsantrasyondaki dicamba içeren sıvı besi ortamında (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) 28 gün boyunca büyütülen *Arabidopsis thaliana* bitkisinde homolog rekombinasyon ve A→G nokta mutasyonu (reversion) frekansında kontrole göre önemli derecede artış olduğunu bildirmişlerdir.

Dicamba (Banvel D)'nin klastojenik ve mutajenik etkileri *Tradescantia-mikronükleus* (Trad-MCN) ve *Tradescantia-stamen hair mutation* (Trad-SHM) analizleri kullanılarak çalışılmıştır. Dicamba, *Tradescantia* klon 03 kullanılan Trad-MCN testinde mikronükleus (MCN) frekanslarında doza bağlı bir artışa neden olmuştur. Ancak en yüksek dozlarda (200 ppm ve üzerinde) aşı dalının tomurcuk ve yapraklarında fiziksel hasar ve MCN frekansında azalma gibi doz aşımının belirtileri görülmüştür (Mohammed ve Ma, 1999).

2.1.4. Indole-3-acetic acid (IAA) ve β-naphthoxyacetic acid (BNOA) ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Bitkilerde doğal olarak sentezlenen fakat sentetik olarak üretilen bitki gelişim düzenleyicisi IAA ve tarım alanında yaygın bir şekilde kullanılan sentetik bitki gelişim düzenleyicisi β-naftoksiasetik asitin (BNOA) mutajenik ve rekombinojenik etkileri *Drosophila* kanatlarında somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılarak araştırılmıştır. Aynı bitki gelişim düzenleyicilerinin karsinogenezin erken safhasında olan ölümsüzleştirilmiş insan embriyonik böbrek HEK293 hücrelerinin proliferasyon ve yaşayabilirliği üzerine etkileri MTT ve tripan-mavi (trypan-blue exclusion) analizleri ile incelenmiştir. SMART analizi için, iki farklı melez kullanılmıştır: bir standart ve bir flare-3 ve çoklu tüy işaretleyicisi içeren yüksek biyo aktiviteli (HB) melez. HB melezi, promutajen ve prokarsinojenlerin daha hızlı ve etkin

biyotransformasyonuna izin veren biyo aktivasyon kapasitesine bağılı sitokrom P-450'si arttırılmış karakterize sinekleri kapsamaktadır. Her iki melezde de, iki tip projeni kanadı, inversiyonsuz işaretleyici heterozigotlar ve dengeleyici heterozigotlar analiz edilmiştir. Araştırmacılar, yaptıkları bu çalışmanın sonuçlarına göre, IAA ve BNOA'nın *Drosophila* kanat hücrelerinde mutajenik ya da rekombinojenik olmadığını; ayrıca, hiçbir bitki gelişim düzenleyicisinin HEK293 hücresinin proliferasyon oranına etki etmediğini ancak her ikisinin de yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir (Karadeniz ve ark., 2011).

İndol-3-asetik asit (IAA) ve 2-metil-indol-3-asetik asit (2-Me-IAA)'ın genotoksik etkileri, kültüre edilmiş insan nötrofillerinde alkalın komet yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (Salopek-Sondi ve ark., 2010). Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda, hem IAA hem de 2-Me-IAA (0.01-1 mM konsantrasyon aralığında) ile 2 saat inkübe edilen nötrofillerde, konsantrasyona-bağılı olarak DNA hasarının arttığını; ayrıca, IAA ile muamele edilen insan nötrofillerinde aynı konsantrasyondaki 2-Me-IAA muamelesine göre daha fazla DNA hasarı meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Uysal ve ark. (2010) tarafından, *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak β -naftoksiasetik asitin (BNOA)'ın olası mutajenik etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, toksik-olmayan konsantrasyonlarındaki (500, 100, 50, 10 ve 1 μ g/petri) BNOA uygulamasının, *S. typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşlarında metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda herhangi bir mutajenik ya da promutajenik etki göstermediği bildirilmiştir.

2.1.5. Rastim 30 DKV ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Etken madde olarak % 30 benzolinon (3-(benzyloxycarbonylmethyl)-benzothiazolinone) içeren, ticari formüllü bitki gelişim düzenleyicisi Rastim 30 DKV (RSM)'nin olası mutajenik etkisi beş test sistemi (*Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Vicia faba*, *Barley chlorophyll*, *Drosophila melanogaster*) ile incelenmiştir. RSM, S9 karışımı varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium*'un TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1538 suşlarında His⁺ geri mutasyonlarının (revertant) frekansını arttırmayarak hiçbir bakteri suşunda herhangi bir mutasyona neden olmamıştır. RSM, *Saccharomyces cerevisiae*'da genetik değişimlerin

oranını, başlıca triptofan lokusundaki konvertantların sayısında olmak üzere, az miktarda arttırmıştır. *Vicia faba* analizinden elde edilen verilere göre, RSM *V. faba* kök ucu meristemine muamele sonrasında herhangi bir klastojenik etki göstermemiştir. Ayrıca, en düşük konsantrasyondaki RSM'nin *V. faba* köklerindeki mitotik aktiviteyi önemli derecede arttırmıştır. *Barley chlorophyll* analizinde, her arpa kültürünün (Orbit and Rubin) 3000 den daha fazla bitkisini temsil eden M₁ jenerasyonunun iki yüz ucu klorofil mutantlarının oluşumu için değerlendirilmiştir. Sonuçta kaydedilen herhangi bir klorofil mutanti olmamıştır. *Drosophila melanogaster* analizinde, erkek *D. melanogaster*'lerde her ne kadar eşeye-bağlı resesif letal sinekler bulunmamışsa da eşey hücrelerindeki anöploidi oranı önemli derecede artmıştır (Miadoková ve ark., 1994).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak ilaç ve alkol kullanmayan, sigara içmeyen ve sağlıklı 20-25 yaşları arasında iki bayan ve iki erkekten alınan periferik kan ve test maddesi olarak 1-naftilasetamid kullanılmıştır.

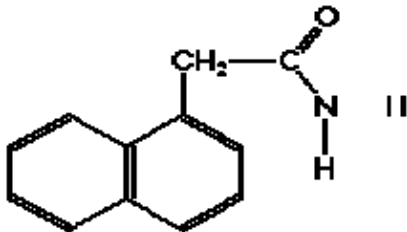
Bu çalışmanın etik kurallara uygunluğu, Mersin Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22/12/2011 tarih ve 2011/104 Nolu kararı ile onaylanmıştır.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. 1-Naftilasetamid

3.1.1.1.1. 1-Naftilasetamidin Özellikleri

Kimyasal adı (IUPAC)	:2-(1-naphthyl)acetamide
Genel adı (CAS)	:1-Naphthaleneacetamide
Sinonimleri	:1-Naphthylacetamide, 2-Naphthalen-1-ylacetamide, Naphthaleneacetamide, alpha-Naphthylacetamide, NAA Amide, alpha-Naphthaleneacetamide.
Ticari Adı	:Rootone, Amid-thin [®] W, Amcotone [®]
Cas no. (Reg no.)	: 86-86-2
Kapalı formül	: C ₁₂ H ₁₁ NO
Açık formül:	



(Anonim, 2014a)

Molekül ağırlığı	: 185.23
Erime noktası	: 180-183 °C
Einacs no	: 201-704-2
Toksosite	: Oral rat LD ₅₀ : 1690 mg/kg
Aktif içerik	: % 98. 0 min

(Anonim, 2014b)

3.1.1.1.2. 1-Naftilasetamidin Kullanım Alanları

Naftalen (naftil) asetatlar yapısal olarak, oksin grubundan doğal bitki büyüme hormonu indol asetik asite benzerlik gösteren bitki büyüme düzenleyicileridir. Naftil asetatlar süs ağaçlarında ve meyve bahçelerinde çiçeklenmeyi geciktirmek ve hasat öncesi meyve dökümünü engellemek için kullanılırlar (Anonim, 2008).

1-Naftilasetamidit oksin hormonu indol-3-asetik aside yapısal olarak benzerlik gösteren bir bitki büyüme düzenleyicisidir (EPA, 2007). 1-Naftilasetamidit, ticari bitki köklendiricilerinin ve bahçe formülasyonlarının içinde bir bileşen olarak 60 yıldan daha uzun bir süredir tarımda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Gardner, 1941; Clarke ve ark., 1941).

1-Naftilasetamidit, 1) Elma, armut, şeftali, üzüm gibi birçok çeşit meyvede meyve seyreltme kimyasalı olarak; 2) Çelik köklendirmek; ve 3) Hasattan hemen önce meyve dökümünü engellemek için kullanılmaktadır (Shrestha, 1986; Segura- Carretero ve ark., 1998; Link, 2000;Untiedth ve Blanke, 2001;EFSA, 2011).

3.1.1.1.3. İnsanların Naftalen Asetatlara Maruz Kalma Durumu

İnsanların naftalen asetatlara maruz kalması yiyecek ve su tüketimi yoluyla, ikamet edilen yer aracılığıyla, bir karıştırıcı/yükleyici/uygulayıcı olarak çalışırken, ya da muamele yapılan yerlere girme ile oluşmaktadır (Anonim, 2008).

a) Naftalen Asetatlar ile Mesleki Maruziyet

İşçiler naftalen asetatlarla pestisidi karıştırırken, yüklerken, uygularken ve uygulama yapılmış ürünlerin takibi ve/veya paketlenmesi gibi aktivitelerin yürütüldüğü yerlere girerken maruz kalırlar. Ayrıca, işçilerin mahsule uygulama yapıldıktan sonra da naftalen asetat kalıntılarına maruz kalabileceği belirtilmiştir. Bu maruziyet durumu sulama, izleme, elle ayıklama, mahsulleri elle toplama, budama, taşıma, yetiştirme ve seyreltme esnasında gerçekleşebilmektedir (Anonim, 2008).

b) Naftalen Asetatlar ile Mesleki Olmayan Maruziyet

Kanada bölgesinde yapılan incelemelerde yaşanan bölgeye bağlı potansiyel maruziyetin yalnızca ev sahiplerinin muamelenin olduğu yerlere girmesiyle oluştuğu görülmüştür. Kanada'da ev sahiplerinin uygulama sonrasındaki aktivitelerde kısa süreli maruziyetlerinin tarla işçileriyle benzer olacağı düşünülmektedir. İçme suyu ile pestisid maruziyeti yüzey suyu ve yer altı suyu kontaminasyonu vasıtasıyla meydana gelebilmektedir (Anonim, 2008).

3.1.1.1.4. 1-Naftilasetamidin Memeliler Üzerindeki Toksik Etkileri

1655 mg/kg bw (body weight)'lik LD₅₀ temel alındığında 1-naftilasetamid için "yutulması zararlıdır" ikazı yapılmıştır. Deri ve solunum yoluyla akut olarak toksik değildir. Deriyi tahriş edici veya deri hassasiyetini arttırıcı değildir, fakat gözü tahriş edicidir ("gözler için ciddi hasar riski" önerilen).

Subakut ve subkronik çalışmalarda tekrarlı maruziyetlerden sonra sıçanlar 5 mg/kg bw/gün NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) ile ilişkili olarak yüksek hassasiyet göstermişlerdir (böbrek ve karaciğer ağırlığında artış, santrilobüller hepatoselüler hipertropi, ince ve kalın bağırsak payer plakalarında ve/veya mukozasında mineralizasyon odaklanması ve kalın bağırsak genişmesi).

EFSA (European Food Safety Authority)(2011) tarafından,1-naftilasetamidin gösterdiği herhangi bir genotoksik potansiyeli olmadığı bildirilmiştir. Aynı zamanda, 1-

naftilasetamidin uzun süreli toksisite ve karsinogenisitesini veya üreme toksisitesi üzerindeki etkilerini bildiren bir veri veya özgün çalışmalar mevcut değildir.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), naftalen asetatların diğer maddeler ile beraber bir toksisite mekanizmasına sahip olup olmadıklarını ya da diğer maddeler ile birlikte toksik bir metabolit üretimine katılıp katılmadıklarını belirlememiştir. Bu nedenle, naftalen asetatların diğer maddelerle birlikte toksik bir mekanizmaya katılmadığı farz edilmiş ve birleşme risk değerlendirmesi gerekli görülmemiştir (Anonim, 2008).

3.1.1.1.5. 1-Naftilasetamidin Ekotoksikolojik Etkileri

1-Naftilasetamidin beslenme maruziyeti yoluyla böcekçil kuşlardaki akut ve kısa dönemli riski, örnek kullanımlar için kademe 1, düşük olarak belirlenmiştir. Kuşlar ile uzun dönemli yapılmış bir toksisite çalışması ne 'DAR'da (Draft Assessment Report) ne de 'Additional Report'da mevcut değildir.

Memelilerde beslenme maruziyeti yoluyla oluşan akut risk kademe 1'de düşük olarak belirlenmiştir. Meyve bahçelerindeki otların ortalama RUD (Residue per Unit Dose) değerini belirlemek için gerçeğe uygun tortu faktörü kullanımı temel alınmış ve memeliler üzerindeki uzun dönemli risk, kademe 2, düşük olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, kuşlar ve memeliler üzerindeki kontamine suların tüketiminden kaynaklanan riskin düşük olduğu belirlenmiştir.

Hedef dışı bitkiler ile yapılmış geçerli toksisite çalışmaları mevcut değildir. Bu nedenle hedef dışı bitkilerin risk durumlarıyla ilgili bir bilgi eksikliği söz konusudur.

1-Naftilasetamidin sucul organizmalara, arılara, hedef dışı eklembacaklılara, solucanlara, hedef dışı toprak mikroorganizmalarına ve atık sulara maruz kalan bitkilerin işlevine olan risk bütün örnek kullanımlar için düşük olarak belirlenmiştir(EFSA, 2011).

Böcekler için risk değerlendirmesi toksik veri yokluğu nedeniyle yapılmamıştır. USEPA, karada yaşayan birçok böcek türünü kapsayan bazı çalışmaların, naftalen asetatların böceklerde önemli olumsuz etkilere neden olmadığını gösterdiğini rapor etmiştir. Bu nedenle, naftalen asetatların böceklerde olumsuz etkiler yaratma potansiyelinin düşük olduğu düşünülmektedir.

Sucul EECs (Expected Environmental Concentration), beklenen jenerik çevresel konsantrasyon modeli kullanılarak hesaplanmıştır. Modelleme, her sezon için tek bir uygulamayı ve 370 g a.e./ha.'lık (acid equivalent/hectare) uygulama oranını temel almıştır. Akut ve kronik risk oranı balıklar (Bluegill sunfish ve Trout) ve sucul omurgasızlar (*Daphnia magna* ve *Tubifex tubifex*) için LOC (Lowest Observed Concentration) sınırını aşmamıştır. Deniz/nehir ağzı ile ilgili veriler mevcut değildir. Tatlı su organizmalarının test edilmesiyle elde edilen veriler temel alınarak, USEPA deniz ve nehir ağzı organizmaları (balıklar, sucul omurgasızlar ve bitkiler) için riskin kaygı seviyesinde olmadığı sonucuna varmıştır.

Kuşlar ve memeliler için EECs çeşitli türlerin tipik yiyecek tüketimi parametrelerini temel alan modelleri kullanarak ve 370 g a.e./ha.'lık uygulama oranını takip ederek hesaplanmıştır. Akut risk oranı küçük otlar, büyük otlar, küçük böcekler ve meyveler ile beslenen kuşlar için LOC sınırını aşmamıştır. Kronik çalışmalar mevcut olmadığı halde, USEPA memeli çalışmalarını temel alan akut ve kronik değerler arasında önemli farklar olmayacağını düşünmektedir.

Karasal bitkiler için EECs, 370 g a.e./ha.'lık uygulama oranı temel alınıp muamele görmüş tarlalara yakın olan arazilerde naftalen asetat kalıntılarını değerlendirme modeli kullanılarak hesaplanmıştır. Kara bitkileri için risk oranı 1.0'lık LOC sınırını geçmemiştir (Anonim, 2008).

3.1.1.1.6. 1-Naftilasetamidin Çevresel Akıbeti ve Davranışı

1-Naftilasetamidin toprakta ayrışırken hangi yolu izlediğine dair geçerli çalışmalar mevcut değildir. Bu nedenle ekstrakte edilemeyen kalıntıların mineralizasyonu ve oluşumu ölçülememektedir. 1-Naftilasetamidin aerobik toprakta ayrışırken izlediği yolla ilgili bir bilgi eksikliği söz konusudur.

Karanlıkta ve aerobik şartlar altındaki mevcut toprak inkübasyonlarında, 1-naftilasetamidin ana metaboliti 1-naftilasetik asiti oluşturarak (>10% uygulanan radyoaktivite (AR)) çok düşük bir kararlılık sergilemiştir. Metabolit olan 1-naftilasetik asit düşük-orta dereceli bir kararlılık sergilemiştir.

Hem ana madde 1-naftilasetamidin hem de onun metaboliti 1-naftilasetik asidin ayrışma oranını gösteren mevcut bilgi yalnızca 2 toprak inkübasyonundan elde

edilmiştir. Güncel bilgilere göre, ayrışma oranı metabolitler için 3, ana molekül için minimum 4 toprakta araştırılmalıdır. Ayrışmanın aerobik oranının belirlenmesinde örnek değerlendirme boyunca ana molekül için en azından 2 ek toprak, metabolit için de bir ek toprak olması gerektiğinden dolayı bir bilgi yetersizliğinin varlığı söz konusudur. Ek çalışmaların tipik tarımı temsil eden değişik özelliklerdeki (özellikle %OM (organic matter content) ve pH koşullarında) topraklarda yapılması tavsiye edilir. Anaerobik toprak koşulları altında ayrışma için ya da topraktaki foto ayrışma için geçerli çalışmalar mevcut değildir. Bu yüzden, 1-naftilasetamidin topraktaki fotolizi ile ilgili bilgi yetersizlikleri söz konusudur.

1-Naftilasetamidin topraktaki hareketliliğiyle ilgili geçerli bir veri mevcut değildir. Ancak, 1-naftilasetik asit toprakta oldukça yüksek bir hareketlilik sergilemiştir.

1-Naftilasetamidin ayrışması, laboratuvar inkübasyonunda çökeltisiz karanlık ve aerobik su sistemlerinde araştırılmıştır. Bu sistemlerde, 1-naftilasetamit doğal sularda yaklaşık %100'e kadar ana metaboliti 1-naftilasetik asiti oluştururken düşük kararlılık (SFO; single first-order) DT₅₀ suda 2.9 - 4.4 gün) sergilemiştir.

1-Naftilasetamit düşük bir buharlaşma potansiyeline sahiptir ve tahmin edilen atmosferik yarılanma süresi 2 günden daha azdır. Bu nedenle, atmosfer yolu ile uzun süre taşınabileceği düşünülmemektedir (EFSA, 2011).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), yüzey ve yer altı sularında naftalen asetat konsantrasyonlarının seviye tarama ölçülerini hesaplamıştır. Yüzey ve yeraltı suları için rafinesiz akut en üst sınır sırasıyla 17.8 ppb (parts per billion) ve 0.001 ppb olarak belirlenmiştir. Yıllık kronik ortalama, yüzey suları için 0.98 ppb'dir. Bu hesaplamalar 370 g a.e./ha'lık (acid equivalent/hectare) maksimum uygulama oranına dayandırılmıştır.

Toprak ve suda yarılanma ömürlerinin her iki ortamda naftilasetik asit için 15 gün, 1-naftilasetamit için 38 gün olduğu hesaplanmıştır. Tortul tabakada yarılanma ömürleri naftilasetik asit için 60 gün, 1-naftilasetamit için 150 gündür (Anonim, 2008).

3.1.1.1.7. 1-Naftilasetamidin Meyvede Oluşturduğu Kalıntı Miktarı

Yalnız olarak 1-naftilasetamit ile ya da bir dizi 1-naftilasetamit, 1-naftilasetik asit ve varyantı 1-naftilasetik asit etil ester uygulaması ile muamele edilmiş elmalarla

ilgili mevcut olan metabolik bilgilerde 1-naftilasetamidin 5.5 günlük yarılanma ömrü ile hızlı bir şekilde 1-naftilasetik asite ayrıştığı görülmüştür. Böylelikle hasatta, mutlak seviye çok düşük olduğu halde (0.002 mg/kg) elmada TRR'nin (toplam radyoaktif kalıntı) hesaplanan yaklaşık %22'si için, 1-naftilasetamit uygulamasından 14 gün sonra ve 1-naftilasetik asitin son uygulamasından 2 gün sonra belirlenebilen tek kalıntı 1-naftilasetik asittir.

1-Naftilasetamit ile sunulan dört tarla kalıntısı deneyinden Güney Avrupa'da yürütülen yalnızca ikisi GAP'ın (doğru tarım uygulamaları) hassasiyetini desteklemeye elverişli bulunmuştur. 2-(1-naftil)asetamit ve 1-naftilasetik asit kalıntıları sırasıyla 0.02 mg/kg ve 0.04 mg/kg olarak bu çalışmalarda kullanılmış analitik metodun LOQ'sunun (limit of quantification; sayabilme sınırı) altında bulunmuştur.

1-Naftilasetamit, elmalara GAP tarafından belirtilen şekilde uygulandığında meyve bahçelerinde gelecek ürünlerdeki kalıntıların bir sorun oluşturacağı düşünülmemektedir.

Çiftlik hayvanlarının maruziyetini ve hayvan matrislerinde kalıntı derecesini değerlendirmek amacıyla mevcut kalıntı test verileri kullanılmış ve hayvan kökenli besinlerde belirgin kalıntıların meydana gelmeyeceği kanısına varılmıştır.

Elmalardaki 1-naftilasetamit için önerilen MRL (maximum residue limit or level), LOQ (limit of quantification) 'de 0.02 mg/kg'dır.

Tüketicilere yönelik kronik ve besinsel akut risk değerlendirmesinde elmada (0.06 mg/kg) (EFSA PRIMo rev.2), Güney EU (Avrupa Birliği) kalıntı testi verilerinde mevcut olan 2-(1-naftil)asetamit ve 1-naftilasetik asit kalıntılarının toplamı kullanılarak TMDI (günlük alınan maksimum teorik miktar), 0.1 mg/kg bw/gün'lük %1'lik ADI'nın (günlük alınan kabul edilebilir miktar) ve IESTI (uluslararası kısa dönemli tahmini alım miktarı), 0.1 mg/kg bw'lik %6'lık ARfD'nin (örnek akut doz) altında bulunmuştur(EFSA, 2011).

Naftalen asetatlar ile yiyecek tüketiminden oluşan en yüksek akut maruziyet bir ile iki yaşındaki çocuklar için aPAD'un (chronic population adjusted dose) %10'unu kaplamaktadır. Naftalen asetatlar ile yiyecek tüketiminden oluşan en yüksek kronik maruziyet ise bir ile iki yaşındaki çocuklar için aPAD'un %8'ini kaplamaktadır. Hem akut hem de kronik beslenme maruziyet ölçülerinin USEPA'nın kaygı seviyesinin altında olduğu bulunmuştur (Anonim, 2008).

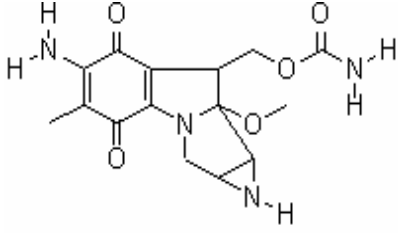
3.1.1.2. Mitomycin C (MMC) (Kyowa)

Mitomycin C, bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı : Mitomycin C

Kapalı formülü : $C_{15}H_{18}N_4O_5$

Açık Formülü:



Molekül ağırlığı : 334.327 g/mol

Erime noktası : 360 °C

CAS No : 50-07-7

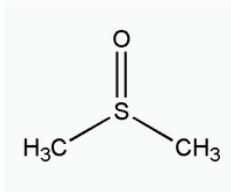
3.1.1.3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma)

DMSO, bu çalışmada 1-naftilasetamidin eriticisi olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı : Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Kapalı formülü : C_2H_6SO yahut $(CH_3)_2SO$

Açık Formülü:



Molekül ağırlığı : 78.13

Yoğunluğu : 1.1 g/cm³

Kaynama noktası : 189 °C

Erime noktası	: 18.4-190 °C
Safılık düzeyi	: ≥ 99.9
Cas No	: 67-68-5
Sigma No	: 8418

3.1.1.4. Kromozom Medyumu

Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Cat. No. F 5023), hücre kültürü yapmak için kullanılmıştır. Chromosom Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşikler belirtilen miktarlarda bulunmaktadır:

MEM JOKLIK with

Non essential Amino Acids.....	850 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin L.....	2.5 mg

Bu medyum her tüpte 2.5 ml olacak şekilde steril kültür tüplerine steril şartlarda paylaştırılmış ve bu şekilde kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

3.1.1.5. Kolşisin (Sigma)

Kolşisin (Colchicine), preparatların hazırlanmasında mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolşisine ait özellikler aşağıda verilmiştir:

Kimyasal adı	: Colchicine
Kapalı formülü	: $C_{22}H_{25}NO_6$
Molekül ağırlığı	: 399.4

Etil asetat içeriği : % 3.4
Kloroform içeriği : < % 0.1
Sigma No : C-9754

3.1.1.6. Hipotonik Eriyik

% 0.4'lük KCl (Merck) hipotonik eriyik olarak kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınmış, 37 °C'deki inkubatrde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.7. Fiksatif

KA deneylerinde 1 hacim asetik asitin 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanılmıştır. MN deneyleri için birinci fiksatif, 1 hacim glasiyal asetik asit: 5 hacim metanol ve 6 hacim % 0.9 NaCl (1/5/6 glasiyal asetik asit/metanol/%0.9'luk NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır. Diğer iki fiksatif ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanolün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Fiksatifler, her preparasyonda kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır.

3.1.1.8. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Bu eriyik, Sorensen Tampon A ve Sorensen Tampon B olmak üzere iki stok zelti halinde hazırlanmıştır.

Hazırlanışı

Sorensen Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içerisinde eritilmıştir (pH= 4.8).

Sorensen Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içerisinde eritilmıştir (pH= 9.3).

3.1.1.9. Giemsa (Merck)

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış % 5'lik boya eriyiği kromozomları ve MN testinde nükleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.1.1.10. Entellan (Merck)

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirine yapıştırmak için kullanılan yapışkan sıvıdır (Cat. No. 7961).

3.1.1.11. Nitrik Asit (HNO₃)

Lamları temizlemek amacıyla 1N HNO₃ çözeltisi kullanılmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

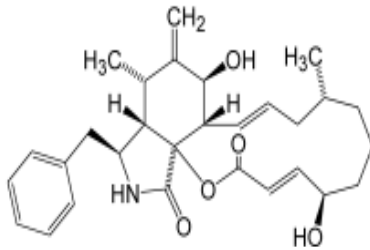
3.1.1.12. Cytochalasin B (Sigma)

Mikronükleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

Kimyasal adı : Cytochalasin B

Kapalı formülü : C₂₉H₃₇NO₅

Açık Formülü:



Molekül ağırlığı	: 479.61 g/mol
Erime noktası	: 218-223 °C
Kaynama noktası	: 218-223 °C
Safılık düzeyi	: %98
CAS No	: 14930-96-2
Sigma No	: C-6762

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Hassas Terazı

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki OHAUS PIONEER™ marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2. Santrifüj

Çalışmalarda rotor çapı 18 cm, 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dakikalık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli HETTICH ROTOFIX marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS CX21 marka ışık mikroskobu preparatları incelemek için kullanılmıştır.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye kadar ısıtılmasında ELEKTRO. MAG marka 0-100 °C ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.5. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kan ekiminin yapılması, test solüsyonlarının hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, sürgülü cam pencere ve floresan ışıklı 'ELİCENT' marka flow kabin kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce lamlar dik şaleye dizilmiş ve şale, lamların üzeri iyice örtülecek şekilde 1 N HNO₃ çözeltisi ile doldurulmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda lamlar, yarım saat boyunca akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2. Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen (20-25 yaşları arası) iki bayan ve iki erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan örneklerinden 6 damla (0.2 ml) steril şartlarda 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Hücre kültürü inkübatörde 37±1 °C'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

1-Naftilasetamidin etkisini incelemek amacıyla kültür bitiminden 24 ve 48 saat önce 20, 40, 80, 160 µg/ml 1-naftilasetamid kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, DMSO ilave edilmiş bir eritici kontrolü ve MMC ilave edilmiş bir pozitif kontrolü vardır. Eritici kontrolde, her kültür tüpüne 20 µl DMSO konmuştur. Pozitif kontrolde, her kültür tüpüne 20 µl MMC (son konsantrasyonu 0.20 µg/ml olacak şekilde) ilave edilmiştir. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden 35 µl (konsantrasyonu 0.06 µg/ml) ilave edilmiş

ve tüpler hafifçe sallanarak karıştırılmıştır. Kültür süresinin sonunda (72. saatin bitiminde) kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri içeren 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C'ye kadar ısıtılan hipotonik eriyik (KCl) ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi hücrelerde kümeleşmeyi engellemek için damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır ve hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra ağzı kapatılan tüpler inkübatöre konmuştur. Hücreler 37 °C de 12 dk. boyunca hipotonik eriyik ile muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda süpernatant atılmıştır. Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırılarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif (1/3 glasiyal asetik asit: metanol) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır. Üçüncü fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir. Tüpün dibinde kalan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve içine 4-5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pastör pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamın üzerine 75 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerine yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara dağıtılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.2.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

% 5'lik Giemsa boyasının hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 100 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.72). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kâğıdı yardımıyla süzölmüştür.

Kurumuş olan preparatlar doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 20 dk. boya içerisinded bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve

üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır. Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

3.2.2.3. Kromozom Anormalliği İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar OLYMPUS CX21 marka ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10 x 100 = 1000 büyütmede). Bu incelemeler sırasında kromozomal anormallikleri ve aynı preparatlarda toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı dolayısıyla mitotik indeks (MI) belirlenmiştir.

3.2.2.3.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (dört kişiden toplam 400 hücre) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. İnceleme sırasında, bu hücrelerde gözlenen kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kromatid değişimi, disentrik kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, halka kromozom gibi yapısal (kromozom tipi ve kromatid tipi anormallikler) ve sayısal kromozom anormallikleri Paz-y-Miño ve ark. (2002)'na göre kaydedilmiştir. Bu incelemeler sonucunda saptanan kromozom aberasyonları kromatid tipi anormallikler, kromozom tipi anormallikler ve kromozom sayısı anormallikleri olmak üzere üç grup içerisinde değerlendirilmiştir. Kromatid tipi anormallikler kromatid kırığı ve kromatid değişimi gibi anormallikleri içermektedir. Kromozom tipi anormallikler içerisinde ise kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, kardeş kromatid birleşmesi ve halka kromozom gibi anormallikler yer almaktadır. Kromozom sayı anormalliklerini ise poliploidi ve endoreduplikasyon oluşturmaktadır. Saptanmış olan kromozom aberasyonlarından hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliği, hücre başına düşen toplam kromozom anormalliği ve kromozom aberasyonu içeren anormal hücre yüzdesi hesaplanmıştır.

Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar, Kauderer ve ark. (1991)'nın bildirdiğine göre Preston (1987)'a uygun olarak ayırt edilmiştir:

Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ile kromatid veya kromozom kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir.

3.2.2.3.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

1-Naftilasetamidin mitoz bölünme üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MI saptanmıştır. MI'ı belirlemek için her kişinin her konsantrasyonuna ait preparatlarda toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 3 bin hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

3.2.3. Mikronükleus (MN) ve Nüklear Tomurcuk (N_{TOM}) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.2.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

1-Naftilasetamidin insan periferik kan lenfositlerinde mikronükleus ve nüklear tomurcuk oluşumu üzerine etkilerini saptamak amacıyla *in vitro* sitokinez-bloklama mikronükleus yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (Rothfuss ve ark., 2000; Fenech, 2000; Kirsch-Volders ve ark., 2003). Bu yöntemle göre, sağlıklı insanlardan alınan periferik kanın 0.2 ml'si, 2.5 ml kromozom medyumuna ekilerek 37 °C'de 68 saat inkübe edilmiştir. 20, 40, 80 ve 160 µg/ml konsantrasyonlardaki 1-naftilasetamid, kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, bir eritici kontrolü ve bir pozitif kontrolü

yapılmıştır. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücreler hipotonik eriyikle (% 0.4 KCl) 37±1 °C'de 5 dakika muamele edilmiştir. Hipotonik solüsyon, KA deneylerinde olduğu gibi yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilmiştir. Hipotonik eriyik ile muamelenin ardından kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak birinci fiksatif (1/5/6= glasiyal asetik asit/metanol/%0.9 NaCl) ile muamele edilmiştir. Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dk. muameleden sonra 1200 rpm'de 10 dk. daha santrifüjlenen tüplere iki kez glasiyal asetik asit/metanol (1/5) ilavesi yapılarak 20 dk. oda sıcaklığında fiksatif muamelesi yapılmıştır. Sonra santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamlar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

3.2.3.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 20 dk. boyanmış ve 3 ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.3. Mikronükleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar OLYMPUS CX21 marka ışık mikroskopunda 10x40=400 büyütmede incelenmiştir.

3.2.3.3.1. Mikronükleus ve Nüklear Tomurcuk Sayısının Saptanması

Mikronükleus ve nüklear tomurcuk sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binüklear) toplam 1000 hücre incelenmiş (Şekil 3.2.) ve bu binüklear hücreler

içerisinden mikronükleus ve/veya nüklear tomurcuk taşıyanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronükleus sayısı belirlenmiştir. Mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücrelerin toplam hücre sayısına oranlaması ile mikronükleuslu hücre oranı, toplam mikronükleus sayısının incelenen iki nükleuslu hücre sayısına bölünmesiyle ise hücre başına düşen mikronükleus sayısı (MN/hücre) hesaplanmıştır. Bundan da MN %'si belirlenmiştir. Ayrıca, nüklear tomurcuk taşıyan binüklear hücre bidesi (‰) belirlenmiştir.

Binüklear hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN'lar sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN'lar ana nükleus gibi boyanmalıdır; (6) MN'lar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

Nüklear tomurcuklar, nükleus içindeki elimine olmuş DNA tamir kompleksleri ve kontrolsüz DNA artış mekanizmasını temsil eder. Nüklear tomurcuk ayırımı Fenech (2007)'e göre yapılmıştır. Nüklear tomurcukların karakteristik özellikleri şöyledir;

- Nüklear tomurcuklar görünüşte mikronükleusa benzerler ancak tomurcuğun çapından daha ensiz bir köprü aracılığıyla ya da fişkırmış olan çıkıntı noktasından çok ince bir köprü ile nükleusa bağlanırlar.
- Nüklear tomurcuklar genellikle mikronükleus ile aynı boyama yoğunluğuna sahiptir.
- Bazen de nüklear tomurcukların nükleusa komşu bir koful içerisinde bulunduğu görülebilir.

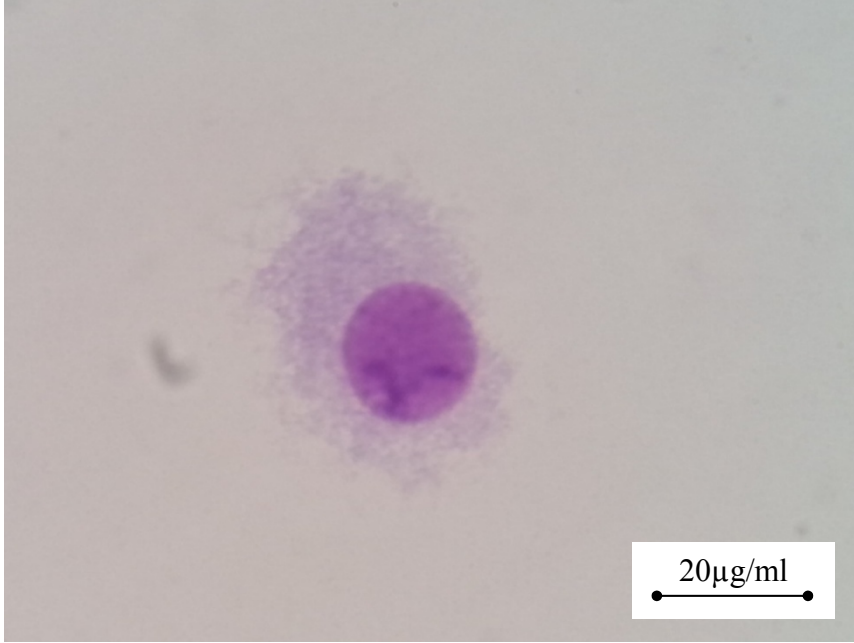
3.2.3.3.2. Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını ölçebilmesidir. Bu durum, sitokalasin B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, multinükleuslu (>2) hücrelerin

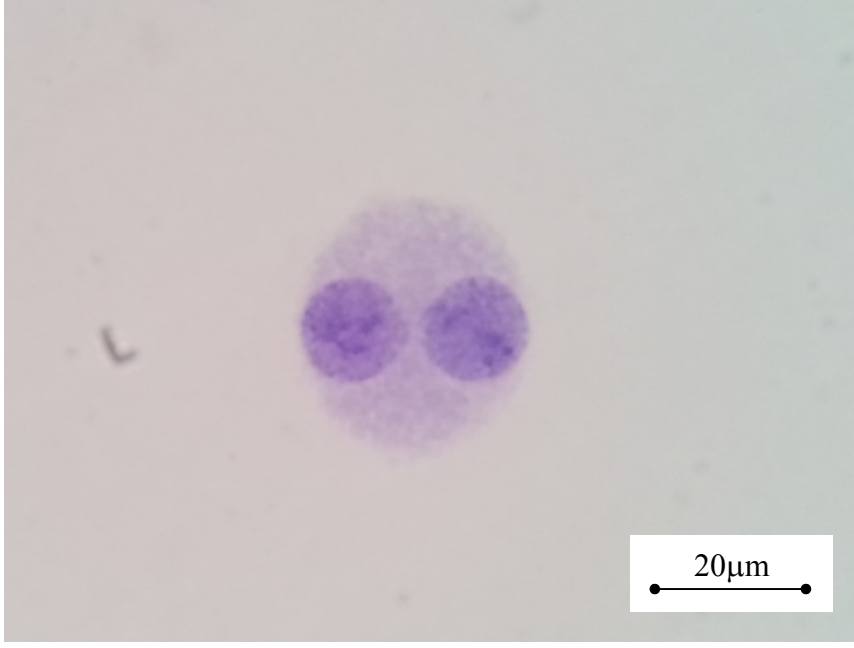
sayılmasıyla yapılır. Nükleus bölünme indeksi (NBI) Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$NBI = (MI + 2MII + 3 MIII + 4 MIV) / N$$

Formüle göre, *MI* bir nükleuslu (Şekil 3.1), *MII* iki nükleuslu (Şekil 3.2); *MIII* üç nükleuslu (Şekil 3.3), *MIV* dört nükleuslu (Şekil 3.4) hücrelerin sayısını, *N* ise toplam hücre sayısını göstermektedir. NBI'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle, MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra NBI'ni belirlemek için tekrar incelenmiştir. NBI için her preparatta toplam 1000 hücre (4 kişi 4000 hücre) sayılmıştır.



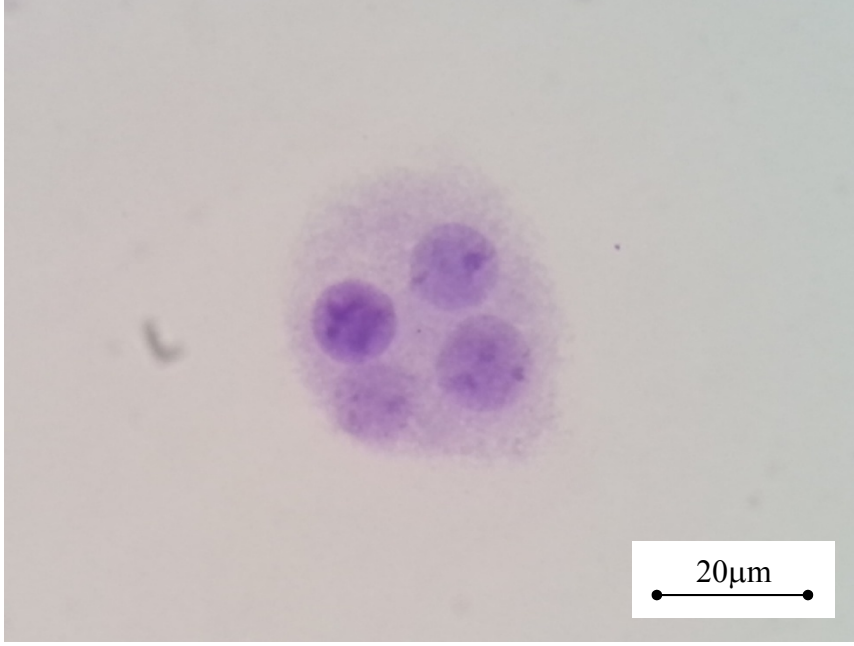
Şekil 3.1. Bir nükleuslu hücre (X1000)



Şekil 3.2. İki nükleuslu hücre (X1000)



Şekil 3.3. Üç nükleuslu hücre (X1000)



Şekil 3.4. Dört nükleuslu hücre (X1000)

3.2.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekimi

Fotoğraf çekme işlemi NIKON marka, Eclipse E200 model trinoküler mikroskoba monte edilen ve Yrd. Doç. Dr. Selahattin KOCAMAN (MKÜ Mühendislik Fakültesi İnşaat Mühendisliği Bölümü) tarafından tasarlanan bir aparat yardımıyla, 8 Megapiksel çözünürlüğe sahip Samsung Note II N7100 markatelefon kullanılarak 1000 büyütmede yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mikroskopta fotoğraf çekimi

İncelemeler sırasında rastlanan bazı kromozom anormalliklerinin, mikronükleus ve nükleer tomurcuk taşıyan binükleer hücreler ile 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz SPSS 11.5 for Windows kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar $P < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Muameleli ve kontrol kültürlerdeki ortalama KA'lı hücre oranları, KA/hücre sayıları, MI, mikronükleuslu binükleer hücre %'si (MNBN %), mikronükleus %'si, nükleer tomurcuk içeren binükleer hücre %'si (N_{TOMBN} %) ve NBI arasındaki farkın önemli olup olmadığı ONE WAY ANOVA (Post Hoc analiz-LSD Test) ile analiz edilmiştir. Ayrıca doz etki ilişkisi olup olmadığı regresyon ve korelasyon analizi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. 1-Naftilasetamidin Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

1-Naftilasetamid ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde, tüm konsantrasyonlardaki (20, 40, 80, 160 µg/ml) yapısal KA taşıyan hücre %'si, anormal hücre %'si ve hücre başına düşen toplam KA (Toplam KA/hücre)'nin kontrole ve eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

1-Naftilasetamid ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde ise 20 µg/ml'lik en düşük konsantrasyonda yapısal KA taşıyan hücre %'si ve anormal hücre %'si sadece kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış gösterirken; test edilen diğer konsantrasyonlarda (40, 80 ve 160 µg/ml) hem kontrol hem de eritici kontrole göre önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir. Hücre başına düşen toplam KA oranı ise 20 ve 40 µg/ml'lik konsantrasyonlardaki 1-naftilasetamid ile 48 saat muamele edilen kültürlerde kontrole ve eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış göstermezken; test maddesinin yüksek iki konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen kültürlerde toplam KA/hücre oranı hem kontrol hem de eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır (Çizelge 4.1). Fakat, 1-naftilasetamid KA'ni tüm süre ve konsantrasyonlarda pozitif kontrol kadar uyarmamıştır.

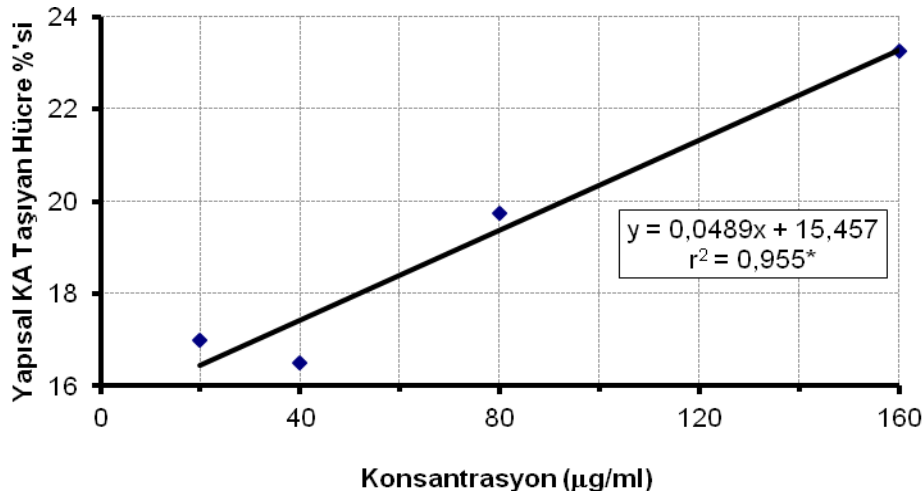
Çizelge 4.1. Değişik Konsantrasyonlarda 1-Naftilasetamit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Lenfositlerinde Kromozom Anormallikleri

Test maddesi	Muamele		Kromozomal Anormallikler			Yapısal KA Taşıyan Hücre %'si ±SH	Anormal Hücre %'si ±SH	Toplam KA/Hücre ±SH	MI ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	Yapısal KA		Sayısal KA				
			Kromatid tipi	Kromozom tipi					
Kontrol	--	--	33	2	0	8.50 ± 0.57	8.50 ± 0.57	0.09 ± 0.01	4.28 ± 0.20
DMSO (EK) MMC (PK)	24	8 µl/ml	35	2	1	8.75 ± 0.95	9.00 ± 1.41	0.10 ± 0.01	4.22 ± 0.52
		0.20	71	63	6	27.50 ± 6.24 a ₃ b ₃	29.00 ± 6.78 a ₃ b ₃	0.35 ± 0.07 a ₃ b ₃	2.29 ± 0.17 a ₃ b ₃
1- Naftilasetamit	24	20	71	10	1	17.00 ± 1.41 a ₃ b ₃ c ₃	17.25 ± 1.70 a ₃ b ₂ c ₃	0.21 ± 0.03 a ₃ b ₃ c ₃	4.24 ± 0.91 c ₃
		40	57	16	2	16.50 ± 1.29 a ₃ b ₂ c ₃	17.00 ± 0.81 a ₂ b ₂ c ₃	0.19 ± 0.01 a ₂ b ₂ c ₃	4.22 ± 1.06 c ₃
		80	72	12	2	19.75 ± 2.21 a ₃ b ₃ c ₂	20.25 ± 2.62 a ₃ b ₃ c ₃	0.22 ± 0.03 a ₃ b ₃ c ₃	3.93 ± 0.87 c ₂
		160	82	23	1	23.25 ± 4.03 a ₃ b ₃	23.50 ± 4.50 a ₃ b ₃ c ₁	0.27 ± 0.05 a ₃ b ₃ c ₂	3.56 ± 0.64 c ₁
DMSO (EK) MMC (PK)	48	8 µl/ml	37	4	0	9.00 ± 0.81	9.00 ± 0.81	0.10 ± 0.22	4.55 ± 0.14
		0.20	180	153	1	54.00 ± 13.83 a ₃ b ₃	54.25 ± 14.00 a ₃ b ₃	0.84 ± 0.34 a ₃ b ₃	2.16 ± 0.10 a ₃ b ₃
1- Naftilasetamit	48	20	69	8	1	17.25 ± 1.70 a ₁ c ₃	17.50 ± 1.91 a ₁ c ₃	0.20 ± 0.02 c ₃	3.20 ± 0.18 a ₃ b ₃ c ₃
		40	83	15	0	21.00 ± 2.82 a ₂ b ₂ c ₃	21.00 ± 2.82 a ₂ b ₂ c ₃	0.25 ± 0.01 c ₃	3.01 ± 0.19 a ₃ b ₃ c ₃
		80	126	22	1	29.75 ± 1.25 a ₃ b ₃ c ₃	30.00 ± 1.63 a ₃ b ₃ c ₃	0.37 ± 0.03 a ₂ b ₂ c ₃	2.71 ± 0.34 a ₃ b ₃ c ₂
		160	135	34	2	33.75 ± 6.13 a ₃ b ₃ c ₃	34.25 ± 6.84 a ₃ b ₃ c ₃	0.43 ± 0.11 a ₂ b ₂ c ₃	2.48 ± 0.46 a ₃ b ₃

a: Kontrol ile; b: Eritici kontrol ile; c: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir
a₁b₁c₁: P≤0.05 a₂b₂c₂: P≤0.01 a₃b₃c₃: P≤0.001

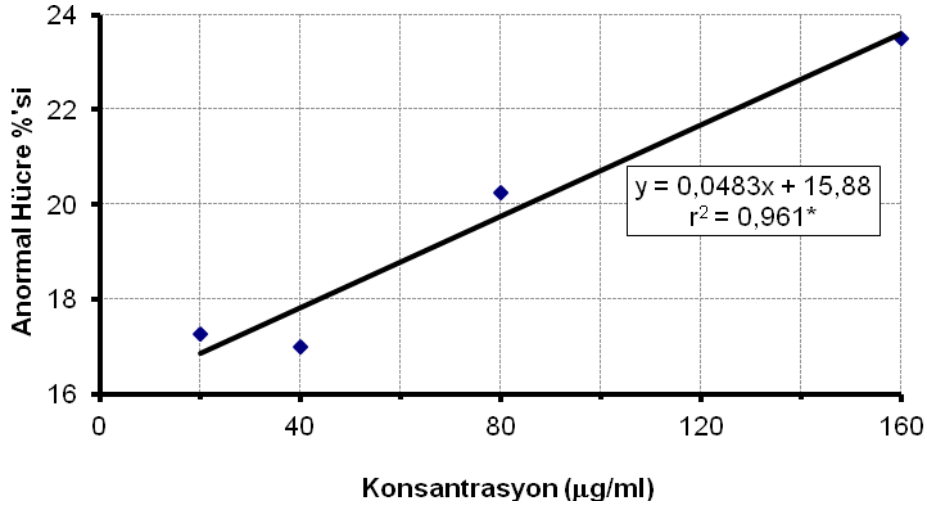
1-Naftilasetamit ile 24 saat muamele edilen kültürlerde yapısal KA taşıyan hücre %'si ($r= 0.977$, $P<0.05$) ve anormal hücre %'si ($r=0.980$, $P<0.05$) istatistiksel olarak önemli bir şekilde konsantrasyona bağlı artış göstermiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). 48 saatlik muamelede ise 1-naftilasetamit konsantrasyonu yükseldikçe yapısal KA taşıyan hücre %'si ($r= 0.942$, $P=0.058$) ve anormal hücre %'si ($r=0.945$, $P=0.055$) değerleri artmış fakat bu artış istatistiksel bakımdan önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). 1-Naftilasetamit, total KA/hücre oranını sadece 48 saatlik muamelede konsantrasyona bağlı olarak ($r=0.948$, $P<0.05$) arttırmış (Şekil 4.3); konsantrasyon-etki ilişkisi 24 saatlik muamelede önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$).

1-Naftilasetamit, insan periferik lenfositlerinde kromatid kırığı (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7), kromozom kırığı (Şekil 4.8), disentrik kromozom (Şekil 4.9), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.10) ve kromatid değişimi (Şekil 4.11 ve 4.12) gibi yapısal, endoredüplikasyon (Şekil 4.13)ve poliploidi (Şekil 4.14) gibi sayısal anormalliklere yol açmıştır.

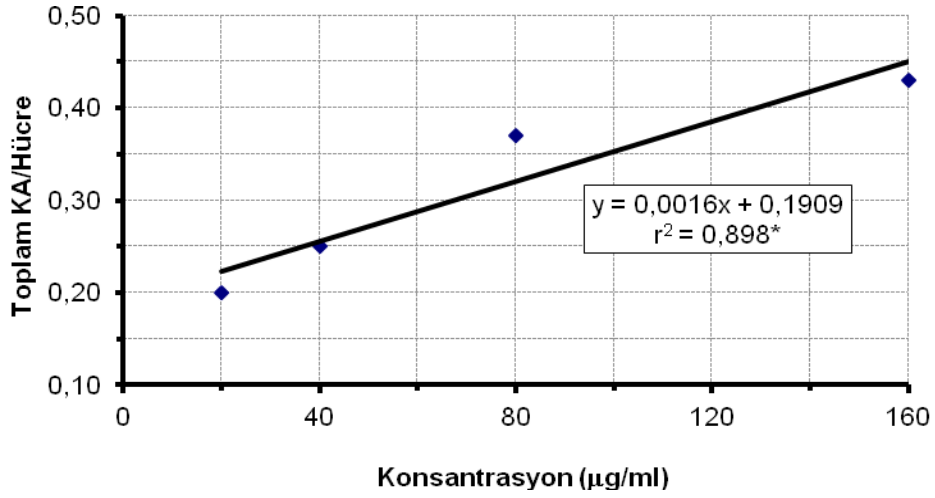


Şekil 4.1. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde Yapısal KA Taşıyan Hücre Yüzdesi'nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

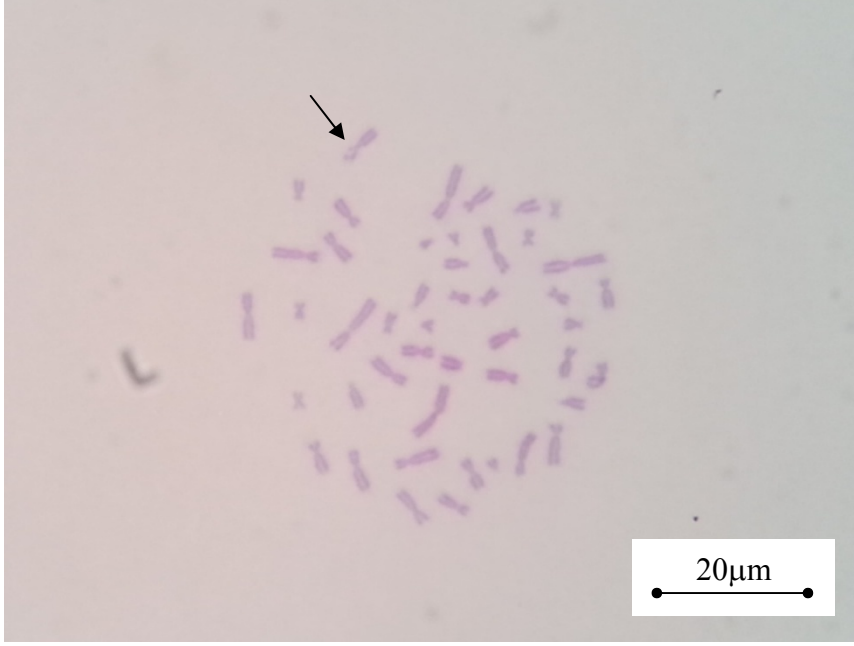
*: $P \leq 0.05$



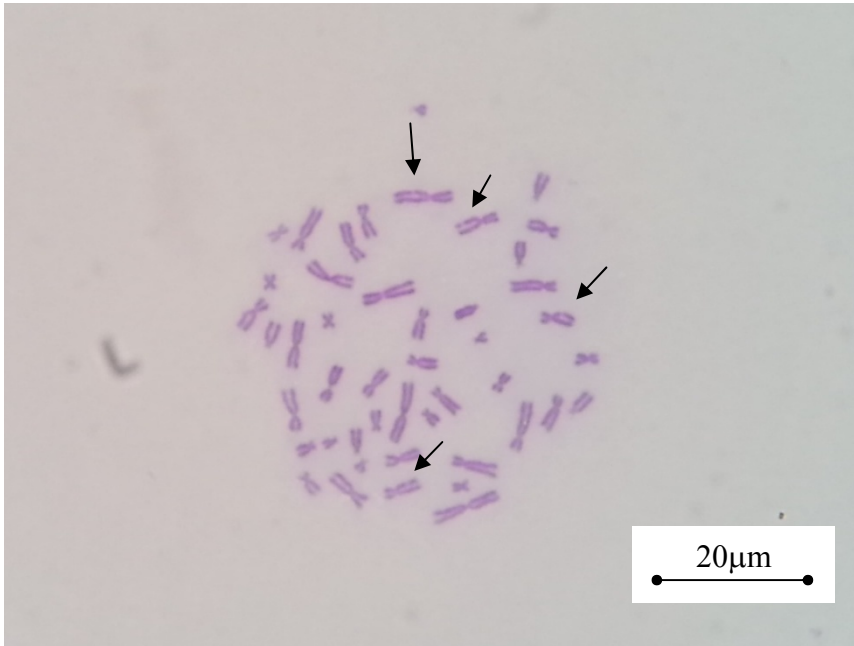
Şekil 4.2. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde Anormal Hücre Yüzdesi'nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı
*:P≤0.05



Şekil 4.3. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde Toplam KA/Hücre'nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı
*:P≤0.05



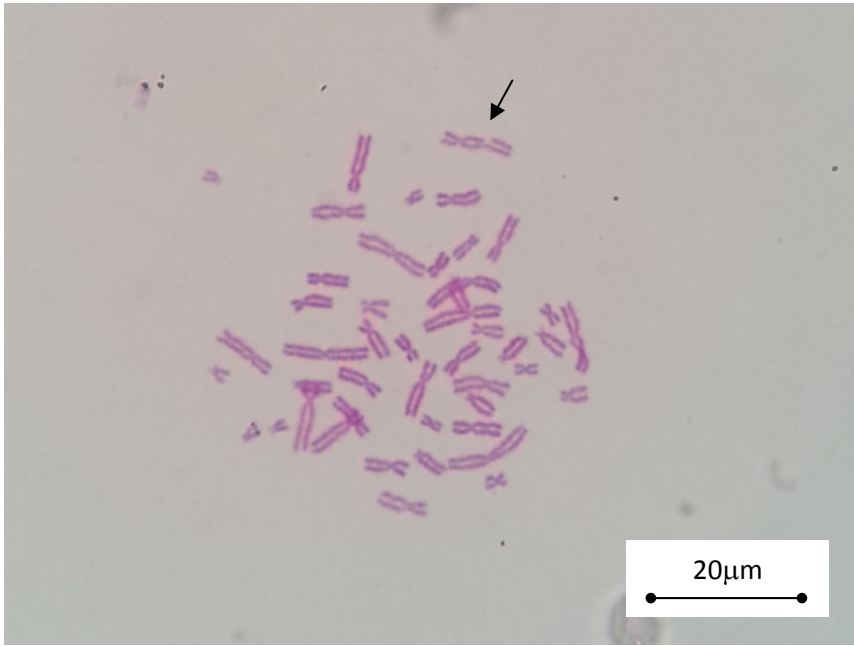
Şekil 4.4. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (160 µg/ml 1-naftilasetamid, 24 saatlik muamele, ♂). X1000



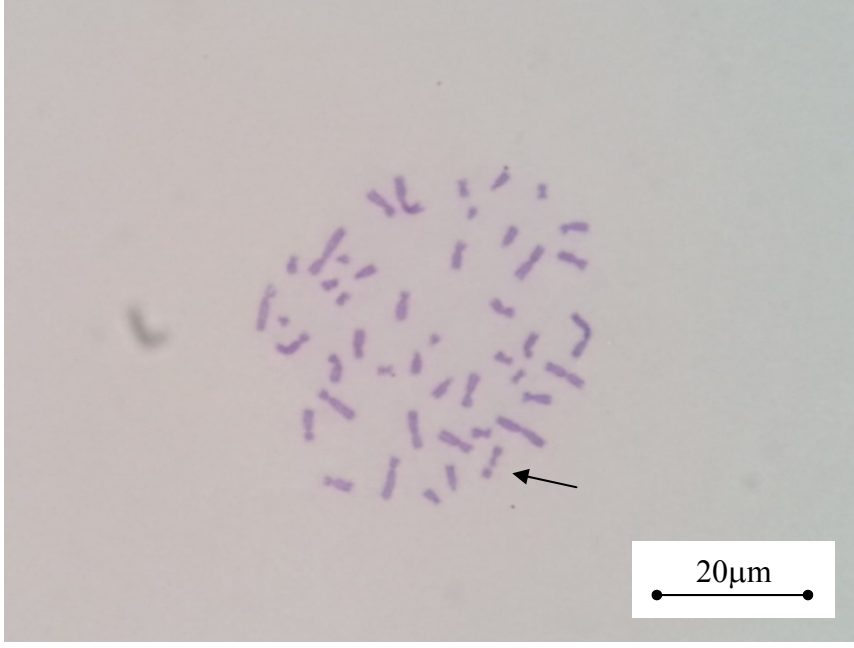
Şekil 4.5. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (20 µg/ml 1-naftilasetamid, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



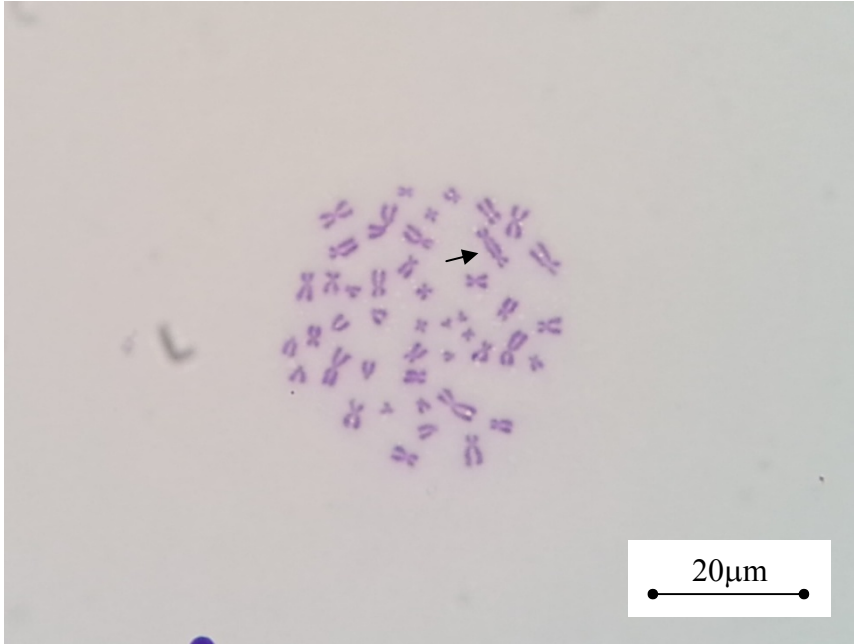
Şekil 4.6. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.7. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (20 µg/ml. 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



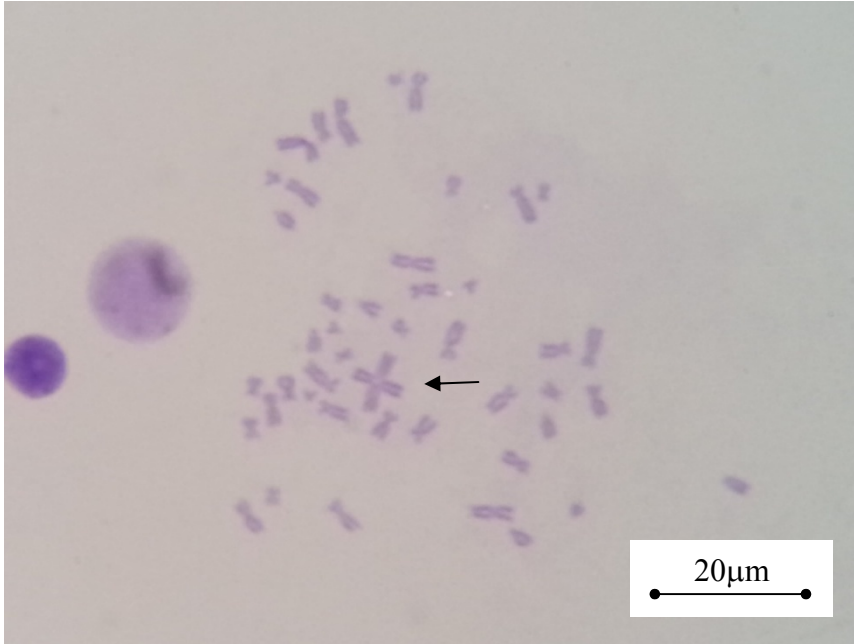
Şekil 4.8. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (40 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



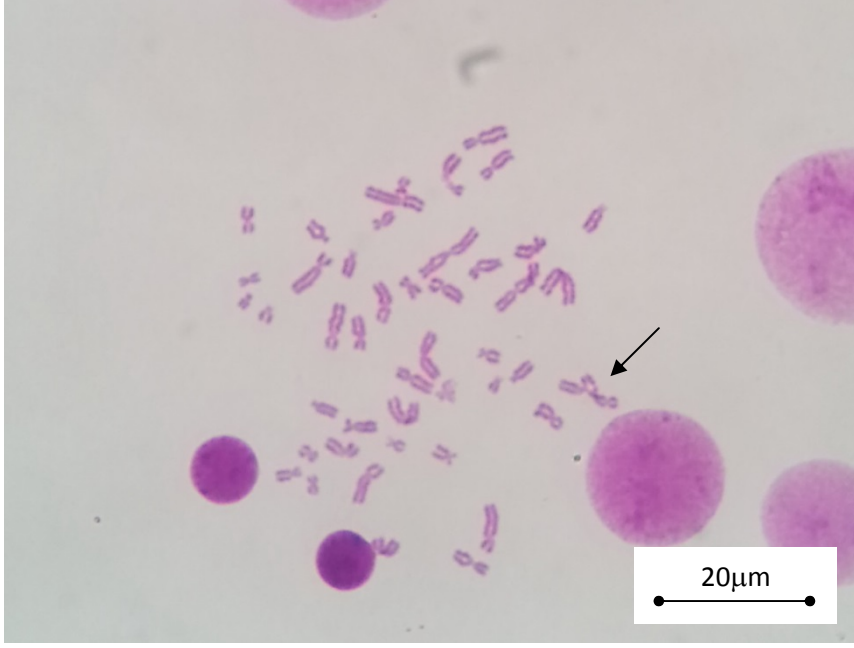
Şekil 4.9. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (80 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



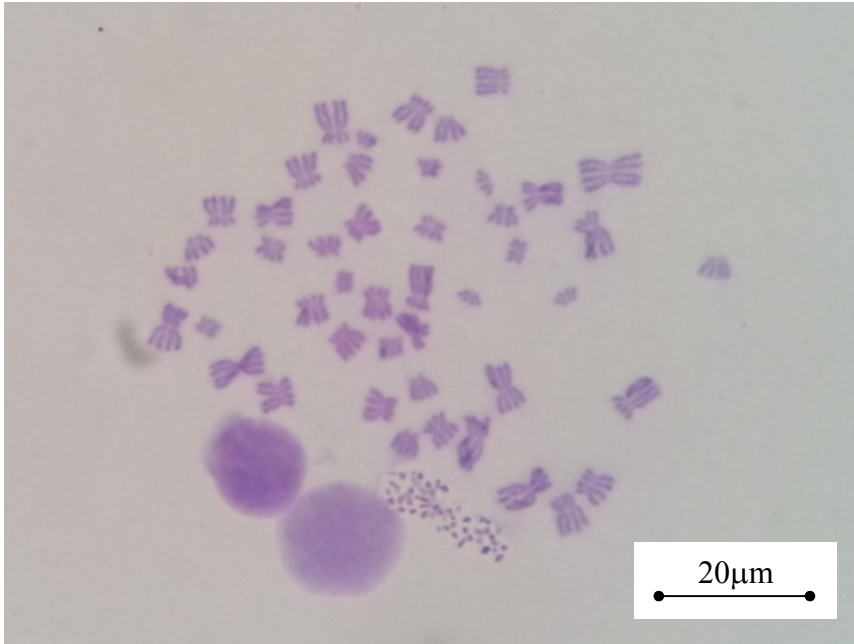
Şekil 4.10. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂). X1000



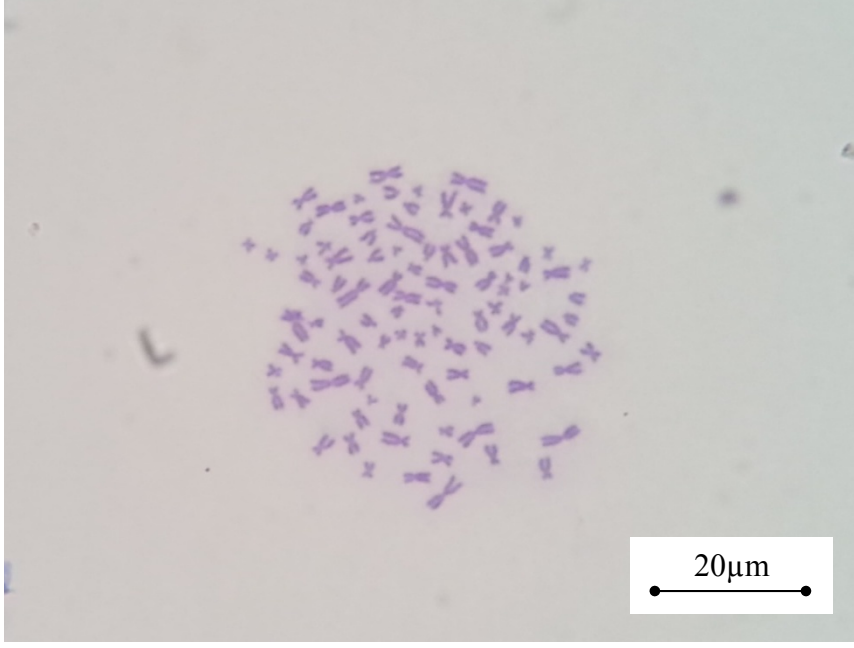
Şekil 4.11. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (160µg/ml, 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂). X1000



4.12. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (160 µg/ml, 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂) X1000



şekil 4.13. Endoredüplikasyonlu (E) metafaz plağı (20 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.14. Poliploidili metafaz plağı (40 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♂). X1000

Literatür araştırmamıza göre 1-naftilasetamidin genotoksik etkilerini belirleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat, Korte ve Jalal (1982) tarafından 1-naftilasetamit gibi yine oksinler grubuna ait sentetik bir bitki büyüme düzenleyicisi olan 2,4-D'nin mutajenik ve klastojenik potansiyelini belirlemek için kültüre edilmiş insan lenfositlerde kardeş kromatid değişimi (KKD) testi yapılmıştır. KKD testi bizim çalışmamızda kullandığımız KA testi gibi genotoksik hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan testlerden biridir. Araştırmacılar, çalışmalarının sonunda elde ettikleri verilere göre; insan lenfositlerine 0.2 µg/ml kadar düşük bir konsantrasyonda 2,4-D uygulanmasının bile istatistiksel olarak önemli olmasa da kromozom hasarı meydana getirdiğini; fakat 2,4-D'nin 50 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanması ile meydana gelen kromozom hasarının kontrole göre istatistiksel olarak önemli derece artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, ayrıca, KKD frekansındaki artış oranı temel alınarak mutajenitenin 10 µg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda önemli olduğu belirtilmiştir. Her ne kadar Korte ve Jalal (1982) tarafından yapılan çalışmada KKD testi kullanılmışsa da kullanılan hücre hattının bizim çalışmamızda kullanılan hücre hattıyla uygunluk (insan lenfositleri) göstermesi, bu çalışmanın sonuçlarının 1-naftilasetamidin 20-160 µg/ml konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde KA frekansını

istatistiksel olarak önemli derecede arttırmasıyla sonuçlanan çalışmamızla uygunluk göstermektedir.

Mustonen ve ark. (1986),fenoksiasetik asit herbisitlerinin etkilerini insan periferel lenfosit kültürlerinde in vitro KA testi ile araştırmışlardır. Araştırmacılar tarafından, saf 2,4-D'nin çalışılan tüm konsantrasyonlarda (0.125, 0.150, 0.200 ve 0.350 mM) kontrole göre anormallik sayısını arttırmazken; 2,4-D'nin ticari formunun (0.125, 0.250, 0.500, 1.000 ve 1.250 mM, fenoksiasetik asit konsantrasyonlarında) in vitro kromozom anormallikleri sayısında önemli bir artışa yol açtığı (dış metabolik aktivasyon sistemi olmadan) bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 1-naftilasetamidin saf formunun genotoksik potansiyeli araştırılmış ve sonuçta saf haldeki 1-naftilasetamitin 20-160 µg/ml konsantrasyon aralığında insan lenfositlerinde KA frekansını kontrole göre önemli derecede arttırdığı bulunmuştur. Buna göre, Mustonen ve ark. (1986) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla uygunluk göstermemekle birlikte, bu çalışmada saf 2,4-D'nin insan lenfositlerinde KA sayısını önemli derecede arttırmaması, kullanılan konsantrasyonların (0.125, 0.150, 0.200 ve 0.350 mM) bizim çalışmamızda kullandığımız konsantrasyonlara göre oldukça düşük olmasıyla açıklanabilir. Aynı çalışmada 2,4-D'nin ticari formülasyonunun düşük konsantrasyonlarda (0.125, 0.250, 0.500, 1.000 ve 1.250 mM) olmasına rağmen KA frekansını kontrole göre arttırması ticari formülasyon içeriğindeki diğer maddelerin etkisiyle olabilir. Buna benzer olarak, Zeljezic ve ark. (2004) tarafından 2,4-D'nin ticari bir formülü olan Deberhan A[®]'nin 0.4 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde eksojen metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda kromozom ve kromatid kırıklarının artışına neden olduğu bildirilmiştir.

Bunun dışında, 2,4-D'nin genotoksik potansiyeli Amer ve Fawzia (2001) tarafından fare kemik iliği, üreme hücreleri ve sperm başındaki anormalliklerde araştırılmıştır. 2,4-D'nin 3.3 mg kg⁻¹ bw. konsantrasyonunun ard arda 3 ve 5 günlük oral uygulamasından sonra kemik iliği ve spermatozoid hücrelerinin kromozom aberasyonları yüzdesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, 2,4-D, sperm başı anormalliklerinin yüzdesinde de konsantrasyona-bağlı bir artışa neden olmuştur. Araştırmacılar, çalışmalarından elde ettikleri sonuçlara göre; 2,4-D'nin test edilen şartlar altında in vivo olarak farelerde genotoksik olduğunu; bu nedenle, 2,4-D'nin yemeklik mahsullerde kullanımında daha dikkatli olunması gerektiğini ve tekrarlı kullanımlarının

sağlık açısından tehlike oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Bu araştırmanın sonuçları da bizim çalışmamızda 1-naftilasetamit için elde ettiğimiz kromozom anormalliklerinin artışı yönündeki sonuçlar ile uygunluk göstermektedir.

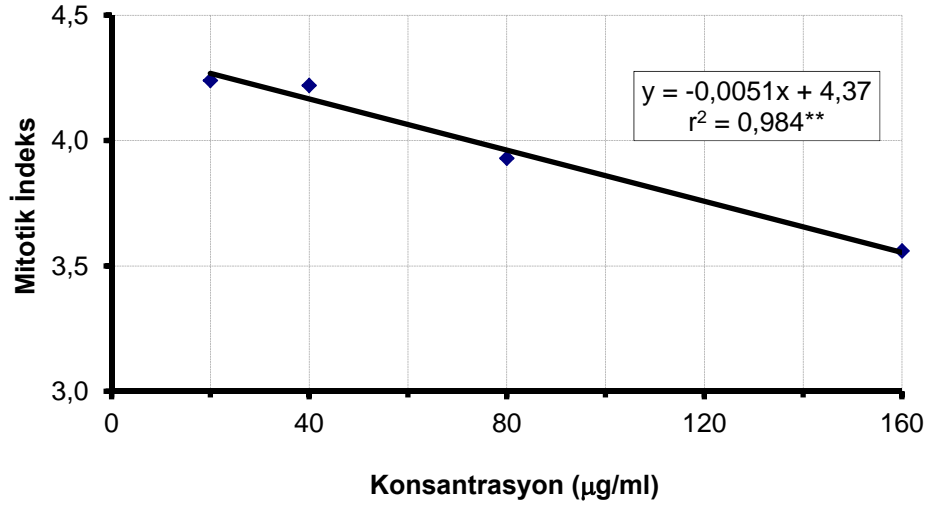
Yaptığımız çalışmanın sonuçları 1-naftiasetamidin tüm süre ve konsantrasyonlarda (20, 40, 80 ve 160 µg/ml), KA'yı kontrol ve çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığını göstermiştir. Çizelge 1 incelendiğinde, 1-naftilasetamidin sayısal kromozomal anormalliklere göre yapısal kromozomal anormallikleri (özellikle kromatid tipi kırıkları) daha fazla attırmış olduğu görülmektedir. Bu da, test maddesinin doğrudan ya da dolaylı olarak (serbest radikal üretimine neden olarak) DNA'nın fosfodiester bağımlı kırarak bir klastojen madde olarak etki yaptığını göstermektedir.

Günümüze kadar, tarımda kullanılan birçok kimyasalın toksisite mekanizmasının süperoksit anyonları, hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin, hücrenin doğal savunma mekanizmasının nötralize edebileceğinden daha fazla oluşumuyla ilgili olduğu bulunmuştur (Lioi ve ark., 1998; Giray ve ark., 2001; Banerjee ve ark., 2001; Muniz ve ark., 2008). Oluşan bu serbest radikaller protein, nükleik asit, lipid gibi makromoleküllerle etkileşime girerek hücrede hasara neden olmaktadır (Mates, 2000).

Test maddemiz olan 1-naftilasetamit doğal bir oksin olan indol-3-asetik asite (IAA) yapısal ve fonksiyonel olarak benzeyen sentetik bir bitki büyüme düzenleyicisidir (EPA, 2007). IAA'ya benzer aktiviteye sahip ve oksin grubuna dahil olan bir başka sentetik bitki büyüme düzenleyicisi olan 2,4-D (Bukowska, 2006) ile yapılan mutajenite çalışmaları bu maddenin doğrudan DNA'da hasar meydana getiren bir ajan olmadığını (Linnainmaa, 1984; Mustonen ve ark., 1986); aksine peroksizomların proliferasyonunu indükleyerek ve DNA'da hasara neden olan hidrojen peroksit ve diğer reaktif oksijen radikallerinin hücre içi üretimini arttırarak (Kawashima ve ark., 1984; Linnainmaa, 1984; Reddy ve Rao, 1989) yüksek klastojenik aktivite (Wolff, 1982) gösterdiklerini göstermiştir. Böylece, 1-naftilasetamidin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırarak, bu moleküllerin DNA veya proteinleri etkileyebileceği ve böylece DNA'da tek ve/veya çift zincir kırıklarına neden olabileceği düşünülebilir.

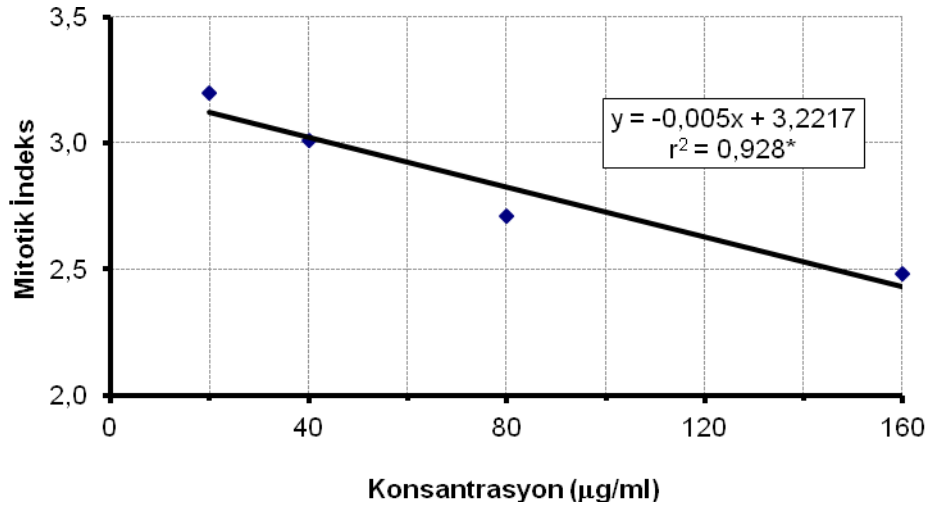
4.2. 1-Naftilasetamidin Mitoz Bölünme (MI) Üzerindeki Etkileri

Mitotik indeks (MI) 1-naftilasetamidin mitoz bölünme üzerine etkisini göstermektedir. 1-Naftilasetamidin mitoz bölünme üzerine etkisine baktığımızda, MI 24 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda (20, 40, 80, 160 µg/ml) kontrol ve eritici kontrole göre bir azalma göstermiş ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. 48 saatlik muamelede ise tüm konsantrasyonlarda MI hem kontrole hem de eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede bir azalma göstermiştir. Ayrıca, 48 saatlik muamelenin en yüksek konsantrasyonunda (160 µg/ml'lik) 1-naftilasetamidin MI değeri ile pozitif kontrolün MI değeri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Ancak, 1-naftilasetamidin diğer tüm süre ve konsantrasyonlarda MI değerini pozitif kontrol kadar düşürmemiştir (Çizelge 4.1). 1-Naftilasetamidin ile 24 saat ($r = -0.992$, $P < 0.01$) ve 48 saat ($r = -0.963$, $P < 0.05$) muamele edilen kültürlerde MI konsantrasyona bağlı olarak düşüş göstermiştir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Farklı dozlarda 1-naftilasetamidin ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MI'nın konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

** : $P \leq 0.01$



Şekil 4.16. Farklı dozlarda 1-naftilasetamid ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MI'nın konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.
*: $P \leq 0.05$

Test maddemiz olan 1-naftilasetamidin sitotoksik etkilerini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte, oksin grubuna giren sentetik bitki büyüme düzenleyicilerinden 2,4-D'nin, HepG2 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve bu etkisini mitokondriyal membran potansiyeline doğrudan etki gösterip apoptosize neden olarak ortaya çıkardığı (Tuschl ve Schwab, 2003); V79 hücre kültürlerinde de 10 µg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik etkiler gösterdiği (Pavlica ve ark., 1991); *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde de bizim çalışmamızdaki gibi MI değerinde düşüşe yol açtığı (Ateeq ve ark., 2002) bildirilmiştir.

Dicamba ve onun ticari formu banvel (%57.71 dicamba)'in *in vitro* tam kan insan lenfosit kültürlerinde hücre döngüsü kinetiğini etkilediği ve hücre döngüsü işleyişinde belirgin bir gecikmeye neden oldukları saptanmış; 100 ve 200 µg/ml'lik dicamba ve 200 ve 500 µg/ml'lik banvel muamelelerinden sonra proliferatif indeks oranında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Araştırmacılar, her iki kimyasalın da kültürlerin mitotik aktivitesinde aşamalı bir doz-ilişkili inhibisyona neden olduklarını bildirmişlerdir (González ve ark., 2006).

Çalışmamızda, 1-naftilasetamidin 48 saatlik muamelesinin test edilen tüm konsantrasyonlarına maruz kalan insan lenfositlerinde, MI değerinin kontrollere göre

istatistiksel olarak önemli derecede düşmesi, test maddesinin sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Birçok araştırmacı tarafından, genotoksik ajanların kromozomal anormalliği ve DNA çift zincir kırıklarının oluşumu indükleyerek sitotoksositeye neden olduğu bildirilmiştir (Armstrong ve ark., 1992; Galloway ve ark., 1998; Hillard ve ark., 1998; Vock ve ark., 1998; Kirkland ve Müller, 2000). Ayrıca, Madle (1993) tarafından, KA içeren hücrelerin mitotik seleksiyon yoluyla döngüden çıkarılarak MI'in düşürülebileceği bildirilmiştir. Mitotik seleksiyon, tamir edilemeyecek kadar kromozom anormalliği taşıyan hücrelerin öldürülmesi ve hücre döngüsünden çıkarılması olayıdır. Bu çalışmada, 1-naftilasetamidin DNA çift ve/veya tek iplik kırıklarına neden olarak kromozom yapı anormalliklerini arttırdığı belirlenmiştir. Böylece, test maddesinin sitotoksik etkisini de bu yolla göstermiş olabileceği düşünülebilir.

4.3. 1-Naftilasetamidin Mikronükleus (MN) ve Nüklear Tomurcuk Oluşumu Üzerine Etkileri

1-Naftilasetamid ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesi (% MNBN) ve MN yüzdesi (% MN) test edilen tüm konsantrasyonlarda (20-160 µg/ml) hem kontrol hem de eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artış göstermiştir (Çizelge 4.2). Ancak, 1-naftilasetamidin 24 ve 48 saatlik muamelelerinde belirlenen MNBN %'si ve MN %'si tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrolden daha düşük bulunmuştur.

Çizelge. 4.2. Değişik Konsantrasyonlarda 1-Naftilasetamid ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si, % MN, Nüklear Tomurcuk İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si ve NBI

Test maddesi	Muamele		MN Sayısına Göre İki Nükleuslu Hücre Sayısı				MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si	% MN ± SH	Nüklear Tomurcuk İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI ±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	0	1	2	3				1	2	3	4	
Kontrol	3987	13	0	0	0.33 ± 0.09	0.33 ± 0.09	0.25 ± 0.50	2937	1020	26	17	1.28 ± 0.05
DMSO (EK) MMC (PK)	24	8 µl/ml 0.20	3986 3940	13 58	1 2	0 0	0.35 ± 0.05 1.50 ± 0.25 a ₃ b ₃	0.38 ± 0.09 1.55 ± 0.26 a ₃ b ₃	0.75 ± 0.50 2.25 ± 1.50 a ₂ b ₁	3085 3506	882 492	21 2	12 0	1.24 ± 0.01 1.13 ± 0.01 a ₃ b ₃
1- Naftilasetamid	24	20 40 80 160	3973 3974 3966 3961	26 25 32 39	1 1 2 0	0 0 0 0	0.68 ± 0.17 a ₁ b ₁ c ₃ 0.65 ± 0.17 a ₁ b ₁ c ₃ 0.85 ± 0.17 a ₃ b ₃ c ₃ 0.98 ± 0.22 a ₃ b ₃ c ₃	0.70 ± 0.21 a ₁ b ₁ c ₃ 0.68 ± 0.17 a ₁ b ₁ c ₃ 0.90 ± 0.21 a ₃ b ₃ c ₃ 0.98 ± 0.22 a ₃ b ₃ c ₃	1.50 ± 1.29 1.50 ± 0.57 1.75 ± 0.95 a ₁ 2.75 ± 0.50 a ₃ b ₂	3272 3390 3479 3676	724 605 521 324	2 2 0 0	2 3 0 0	1.19 ± 0.02 a ₃ b ₁ c ₁ 1.16 ± 0.03 a ₃ b ₃ 1.13 ± 0.02 a ₃ b ₃ 1.08 ± 0.01 a ₃ b ₃
DMSO (EK) MMC (PK)	48	8 µl/ml 0.20	3985 3788	14 198	1 11	0 3	0.38 ± 0.15 5.30 ± 0.67 a ₃ b ₃	0.40 ± 0.18 5.73 ± 0.61 a ₃ b ₃	0.50 ± 0.57 4.25 ± 0.50 a ₃ b ₃	2982 3567	960 426	30 4	28 3	1.28 ± 0.05 1.11 ± 0.02 a ₃ b ₃
1- Naftilasetamid	48	20 40 80 160	3959 3956 3945 *3144	40 42 53 53	1 2 2 3	0 0 0 0	1.03 ± 0.26 a ₂ b ₂ c ₃ 1.10 ± 0.14 a ₂ b ₂ c ₃ 1.38 ± 0.09 a ₃ b ₃ c ₃ 1.75 ± 0.23 a ₃ b ₃ c ₃	1.05 ± 0.30 a ₂ b ₂ c ₃ 1.15 ± 0.17 a ₃ b ₂ c ₃ 1.43 ± 0.12 a ₃ b ₃ c ₃ 1.83 ± 0.27 a ₃ b ₃ c ₃	1.00 ± 1.41 c ₃ 1.00 ± 1.41 c ₃ 1.75 ± 0.50 a ₁ c ₃ 2.50 ± 0.57 a ₂ b ₂ c ₂	3256 3267 3557 3816	719 725 439 184	11 3 4 0	14 5 0 0	1.20 ± 0.04 a ₁ b ₁ c ₁ 1.19 ± 0.04 a ₂ b ₂ c ₁ 1.12 ± 0.03 a ₃ b ₃ 1.05 ± 0.03 a ₃ b ₃ c ₁

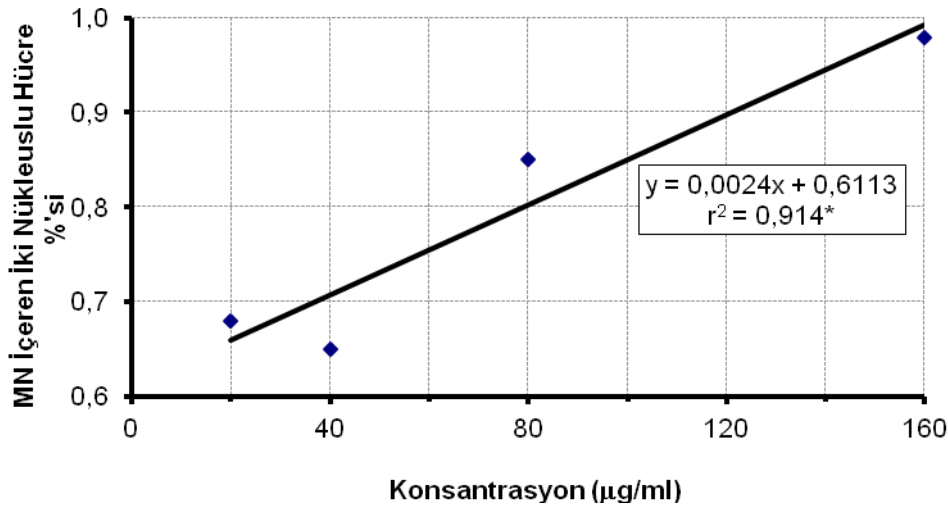
a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁c₁: P ≤ 0.05 a₂b₂c₂: P ≤ 0.01 a₃b₃c₃: P ≤ 0.001

*Yüksek toksisiteden dolayı 3200 tane iki nükleuslu hücre incelendi

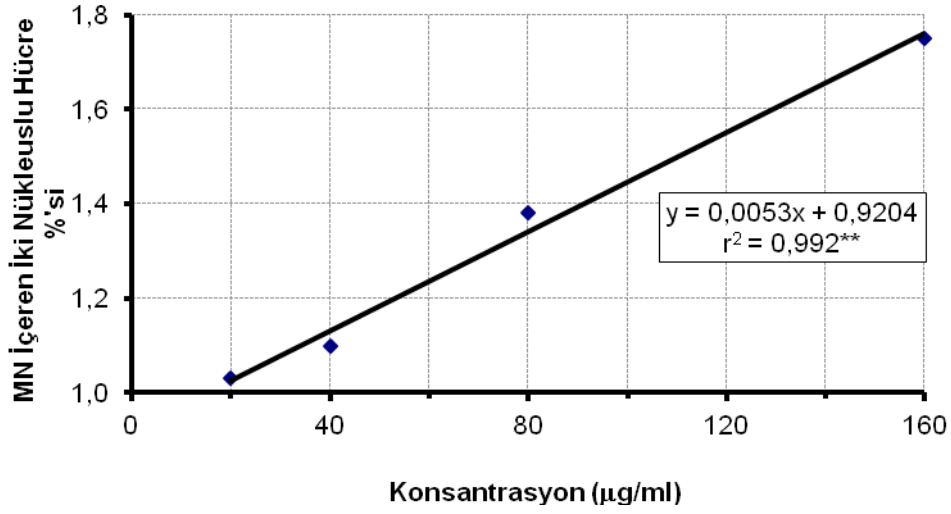
1-Naftilasetamit, hem 24 saatlik hem de 48 saatlik muamelede MN içeren iki nükleuslu hücre oluşumunu (MNBN) konsantrasyona bağlı olarak uyarmıştır (sırasıyla, $r=0.956$, $P<0.05$ ve $r=0.996$, $P<0.01$) (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Ayrıca, 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilen kültürlerdeki MN %'si de konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiş olup ($r=0.997$, $P<0.01$) (Şekil 4.19), 24 saat muamele edilen kültürlerdeki MN %'sinin konsantrasyona bağlı artışı ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$).

1-Naftilasetamit, insan periferik lenfositlerinde iki nükleuslu hücrelerde farklı sayılarda ve büyüklüklerde mikronükleus (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25) oluşumlarına neden olmuştur.



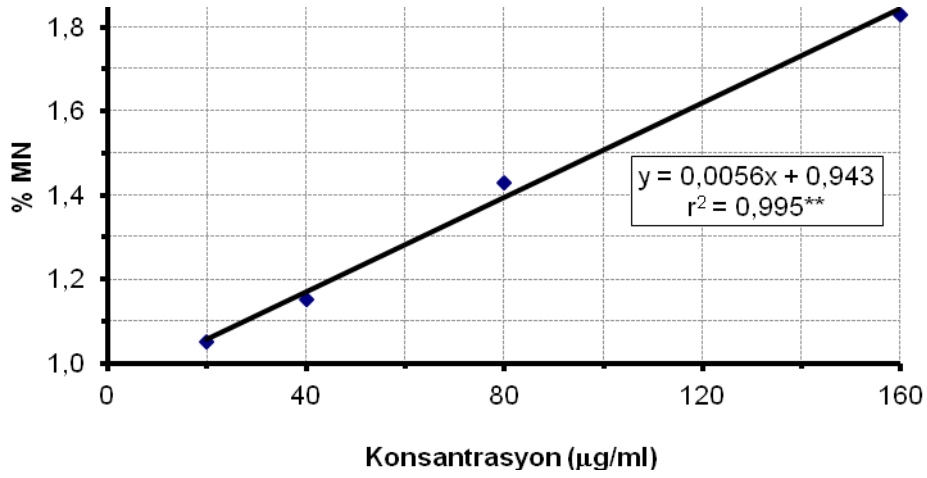
Şekil 4.17. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

*: $P\leq 0.05$



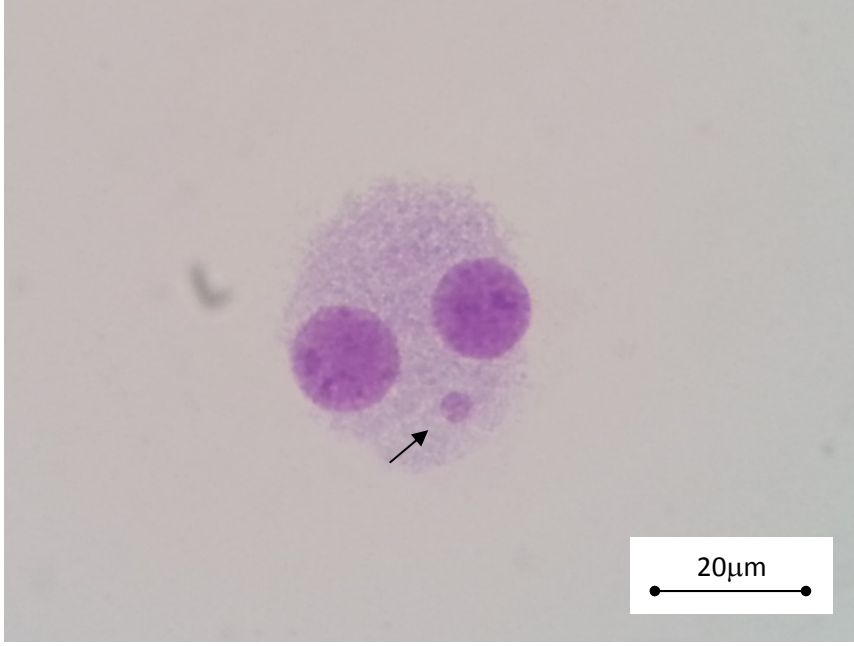
Şekil 4.18. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

** : $P \leq 0.01$

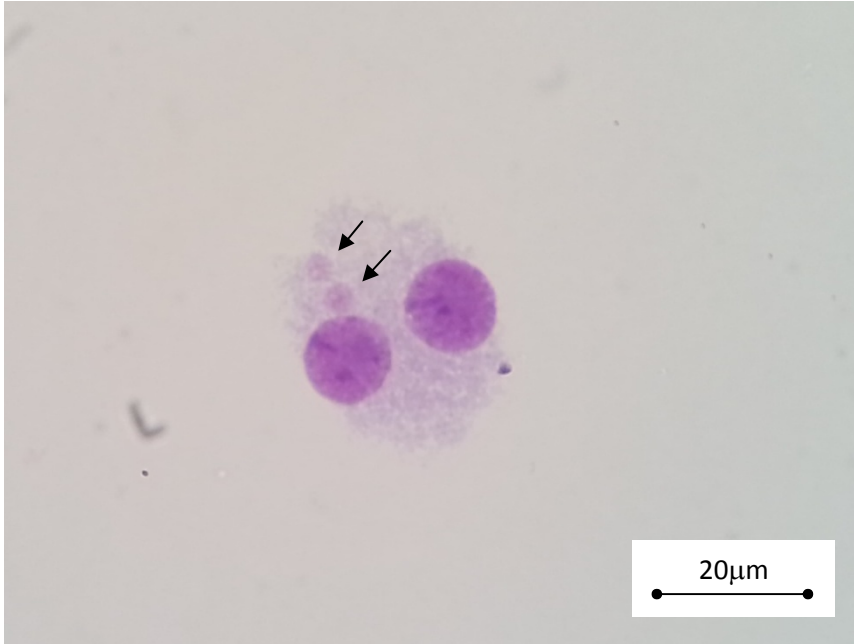


Şekil 4.19. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MN %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

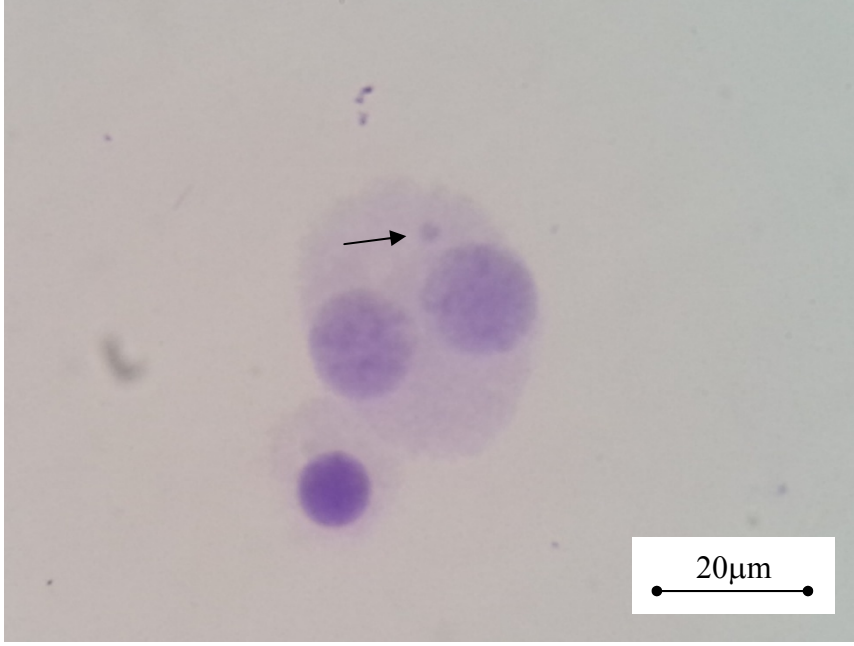
** : $P \leq 0.01$



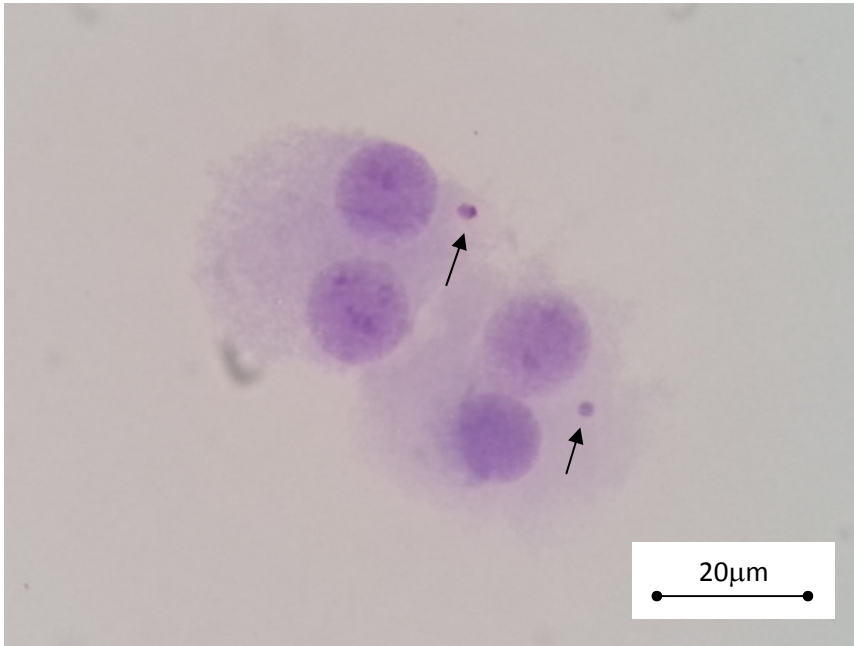
Şekil 4.20. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (20 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂). X1000



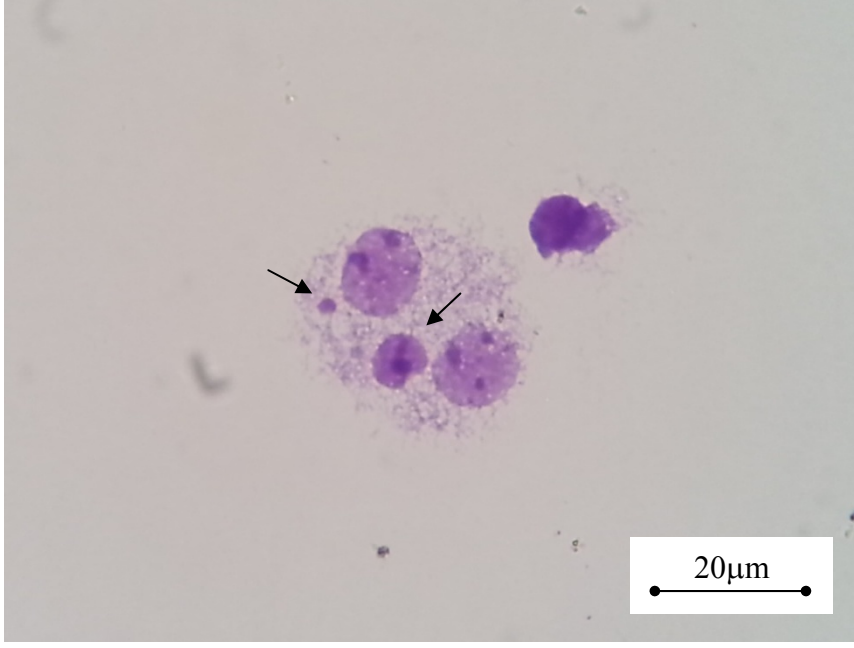
Şekil 4.21. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂). X1000



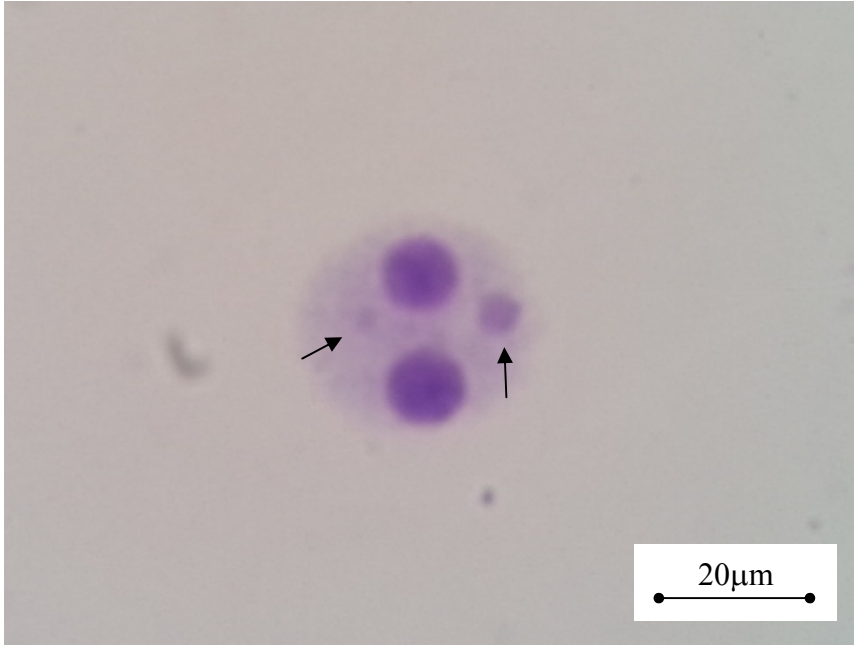
Şekil 4.22. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (40 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.23. Mikronükleus içeren iki nükleuslu iki tane hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♂). X1000



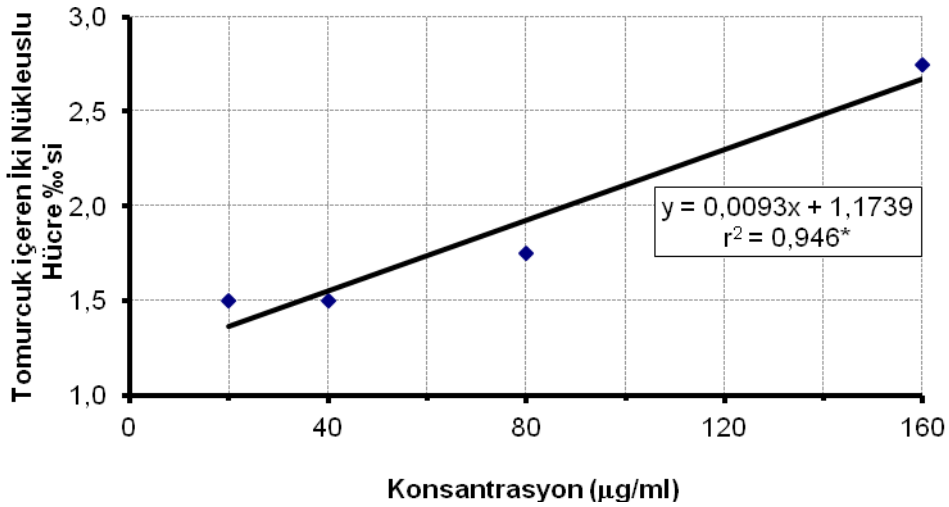
Şekil 4.24. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (80 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.25. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♂). X1000

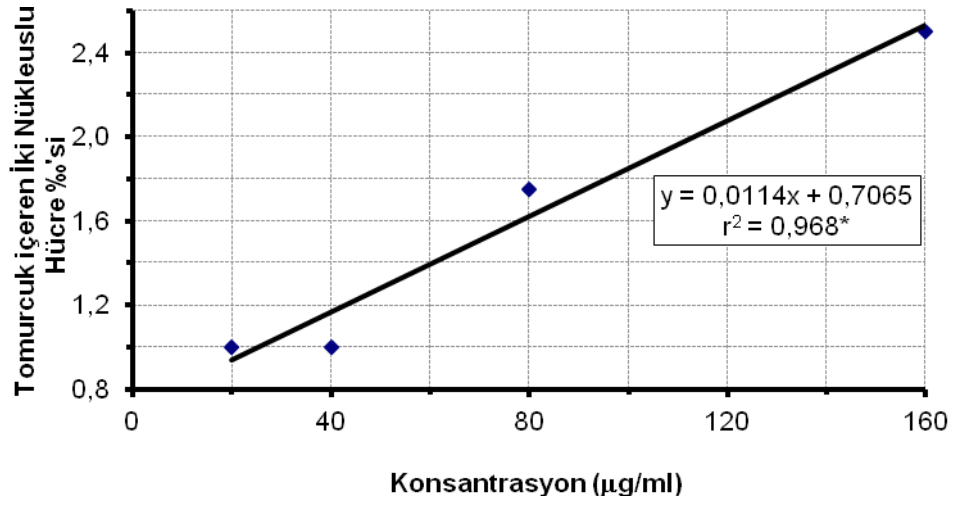
1-Naftilasetamidin insan periferel kan lenfositlerine hem 24 hem de 48 saatlik muamelelerinde, nuklear tomurcuk içeren iki nukleuslu hücre bindesi (NtomBN %), düşük iki konsantrasyonda (20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$) kontrol ve eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış göstermemiş olup; 80 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda sadece kontrole göre, 160 $\mu\text{g/ml}$ 'lik en yüksek konsantrasyonda ise hem kontrol hem de eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir (izelge 4.2). Ayrıca, 1-naftilasetamid 24 saatlik muamelenin tüm konsantrasyonlarında NtomBN %'sini pozitif kontrol kadar uyardıştır. 1-Naftilasetamid ile muamele edilen kültürlerdeki NtomBN %'si hem 24 hem de 48 saatlik muamelede konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiştir (sırasıyla; $r=0.973$, $P<0.05$ ve $r= 0.984$, $P<0.05$) (şekil 4.26 ve şekil 4.27).

1-Naftilasetamid, insan periferel lenfositlerinde iki nukleuslu hücrelerde farklı sayılarda ve büyüklüklerde nuklear tomurcuk (şekil 4.28, şekil 4.29, şekil 4.30) oluşumuna neden olmuştur.

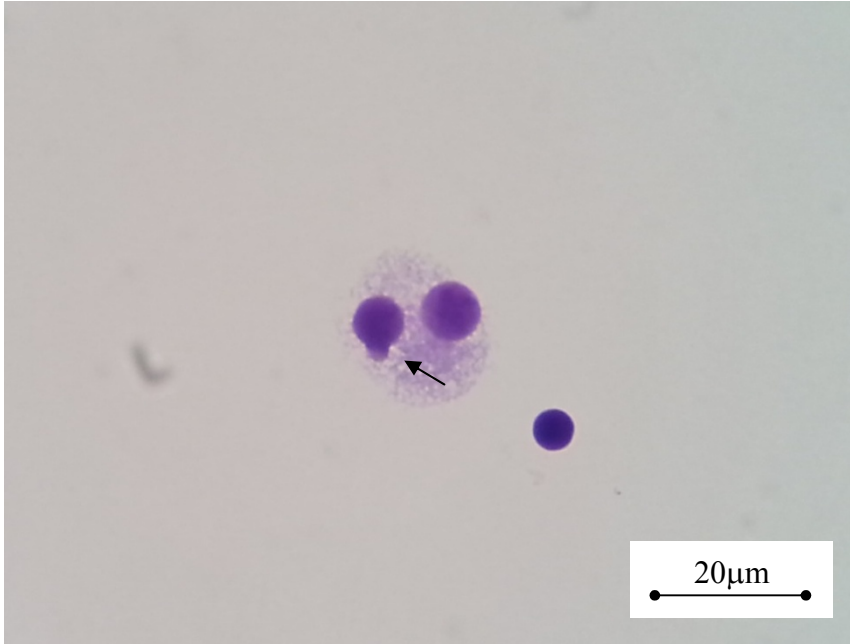


şekil 4.26. Farklı dozlarda 1-naftilasetamid ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde tomurcuk içeren iki nukleuslu hücre bindesinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

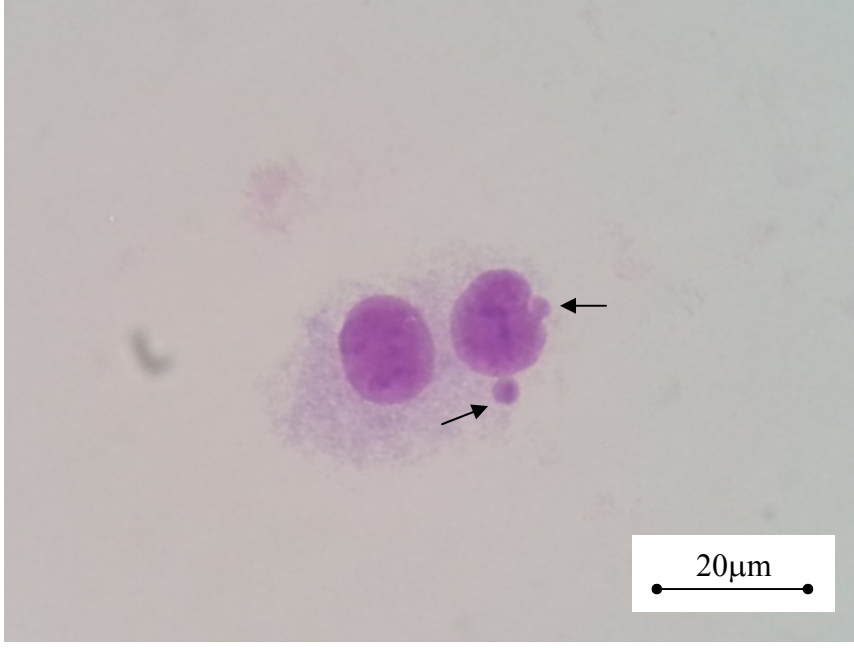
*: $P\leq 0.05$



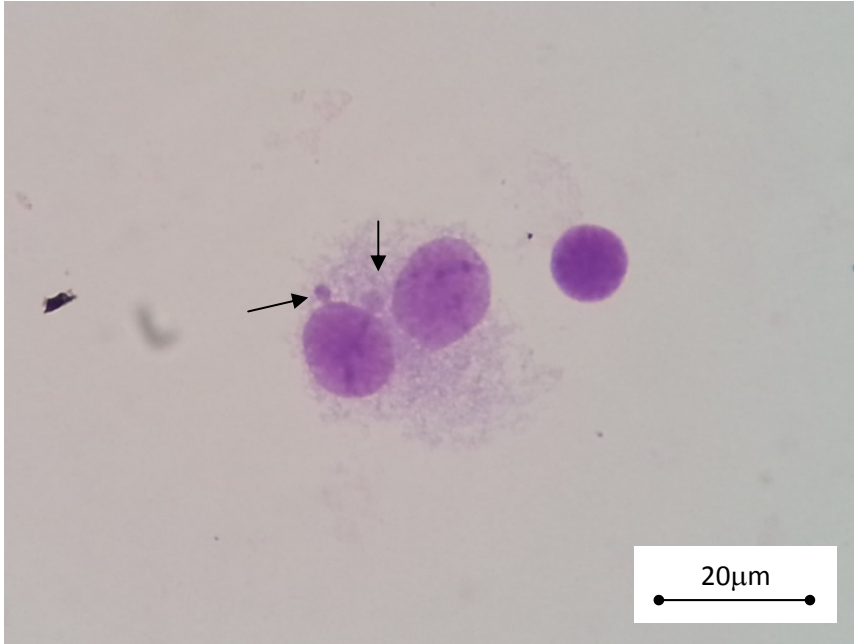
Şekil 4.27. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre bindesi'nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı
*: $P \leq 0.05$



Şekil 4.28. Tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.29. İki tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre (80 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.30. İki tomurcuk içeren iki nükleuslu hücre (160 µg/ml 1-naftilasetamit, 48 saatlik muamele, ♂) X1000

Bizim çalışmamıza benzer olarak, Zeljezic ve ark. (2004) tarafından 2,4-D'nin ticari bir formülü olan Deberhan A[®]'nin insan lenfositlerindeki MN ve nüklear tomurcuk üzerine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada, test maddesinin 0.4 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde MN ve nüklear tomurcuk sayısını kontrole göre önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Bizim çalışmaya kıyasla, bu çalışmada MN ve nüklear tomurcuk sayısındaki artışın çok daha düşük konsantrasyonlarda meydana gelmesi kullanılan test maddesinin ticari formülasyonda olmasından kaynaklanmış olabilir. Çünkü, tarımda kullanılan kimyasalların ticari formülasyonlarının içeriğinde, etken madde dışında çok değişik sayı ve miktarda farklı maddeler de bulunmaktadır ki bu maddeler genotoksisiteyi arttırabilmekte ya da pestisit ve/veya bitki büyüme düzenleyicisinin daha düşük konsantrasyonlarda genotoksik etki gösterebilmesine neden olabilmektedir.

González ve ark. (2011) tarafından, sentetik oksinlerden dicamba ve onun ticari formu olan banvel[®]'in genotoksik etkileri Chinese hamster yumurta hücrelerinde (CHO-K1) 50-500 µg/ml'lik konsantrasyon aralıklarında, bizim çalışmamızda kullandığımız test olan sitokinez-bloklama MN testi ile araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, araştırmacılar tarafından, MN indükleme mekanizmasını belirlemek için CREST anti-kinetokor antikoru analizi uygulanmıştır. Çalışmada, MN'un konsantrasyona bağlı artışı dicamba ve banvel[®] ile sırasıyla 50-400 µg/ml ve 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığındaki muamelelerden sonra gözlemlenmiştir. Nükleoplazmik köprü ve nüklear tomurcuk indüksiyonları da her iki test bileşiğinin etkisiyle önemli derecede artış göstermiştir. Araştırmacılar, dicamba ve banvel[®]'in CHO-K1 hücrelerinde genotoksik hasara yol açtığını; ayrıca MN oluşumlarının hem klastojenik hem de anojenik mekanizmalardan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Sitokinez bloklama MN testinde, iki nükleuslu hücrelerde nüklear tomurcuk sayısındaki artış da DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Fenech, 2006).

Yaptığımız çalışma, yüksek konsantrasyonlardaki 1-naftilasetamidin (80 ve 160 µg/ml) insan lenfositlerinde nüklear tomurcuk oluşumunu kontrollere göre önemli derecede arttırdığını göstermiştir. Nüklear tomurcuk, amplifiye olmuş DNA'nın nükleusun dışına çıkarılmasıyla (Lindberg ve ark., 2007), anafaz köprülerinin kırılması sonucu geriye kalan parçalarla (Gisselsson ve ark., 2000) ya da mikronükleusların

nükleus zarına doğru geri çekilmesiyle (Lindberg ve ark., 2007) oluşabilir. Bu çalışmada nüklear tomurcuk oluşumu kısa süreli (68 saat) lenfosit kültüründe değerlendirilmiştir. Mladinic ve ark. (2009)'na göre kısa süreli kültürlerde nüklear tomurcukların DNA'nın amplifikasyonundan dolayı oluşması mümkün görünmemektedir. Bu nedenle, çalışmamızda özellikle 1-naftilasetamidin yüksek konsantrasyonlarında gözlenen nüklear tomurcukların, MN'un nükleus zarına doğru geri çekilmesiyle oluşmuş olabileceği düşünülmektedir.

MN, asentrik kromozom/kromatid fragmentlerinden veya tam kromozom/kromatidlerin hücre bölünmesi sırasında (anafazda iğ ipliklerine uygun bir şekilde tutunamamaları dolayısıyla) yanlış dağılımları sonucu oluşabilir (Fenech, 2007; Fenech and Bonassi, 2011; Fenech ve ark., 2011). Multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna neden olabilir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). MN oluşumuna hem kromozomlarda yapısal anormalliklere neden olan klastojenik hem de sayısal kromozomal anormalliklere neden anojenik maddeler neden olabilmektedir. Böylece sitokinez-bloklama MN testi ile hem klastojenik hem de anojenik etkiler belirlenebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark., 1997, 2011; Norppa ve Falck, 2003).

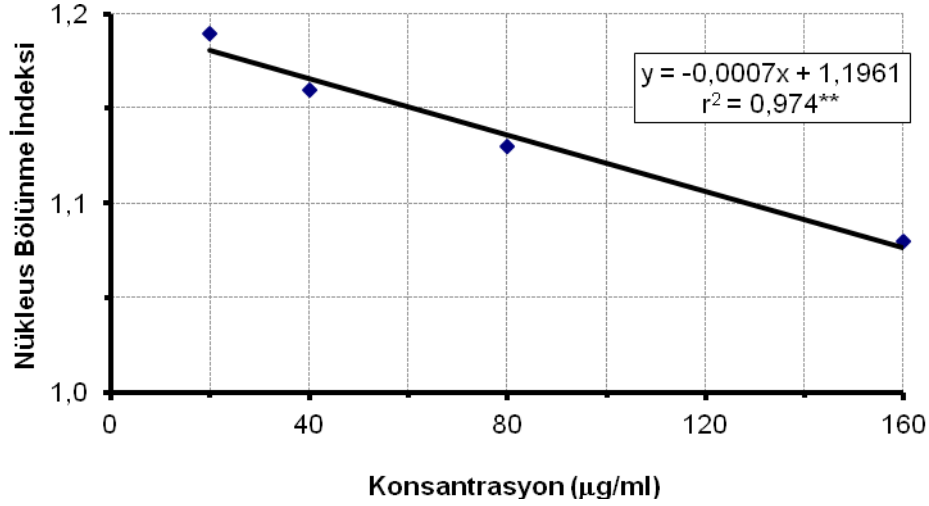
Yaptığımız çalışmada, 1-naftilasetamidin tüm süre ve konsantrasyonlarında, insan lenfosit hücrelerindeki yapısal KA sayısını önemli derecede arttırdığı, sayısal KA üzerine ise önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada gözlenen MN'ların daha çok 1-naftilasetamidin klastojenik etkisiyle oluşan asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından meydana gelmiş olabileceği düşünülebilirse de MN indüklenme mekanizmasının tam ve doğru olarak belirlenebilmesi için CREST anti-kinetokor antikor analizinin uygulanmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

4.4. 1-Naftilasetamidin Nükleus Bölünmesi (NBI) Üzerine Etkileri

1-Naftilasetamidin nükleus bölünmesi üzerindeki etkisi NBI (Nükleus bölünme indeksi) bulunarak saptanmıştır (Çizelge 4.2). Buna göre, 24 ve 48 saatlik muamelelerde, tüm konsantrasyonlarda (20, 40, 80 ve 160 µg/ml) NBI kontrole ve eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede düşmüştür. Ayrıca, 1-naftilasetamidin, 24 saatlik muamelenin bazı konsantrasyonları (40, 80 ve 160 µg/ml) ile 48 saatlik muamelenin 80 µg/ml'lik konsantrasyonunda NBI'ni pozitif kontrol kadar; 48

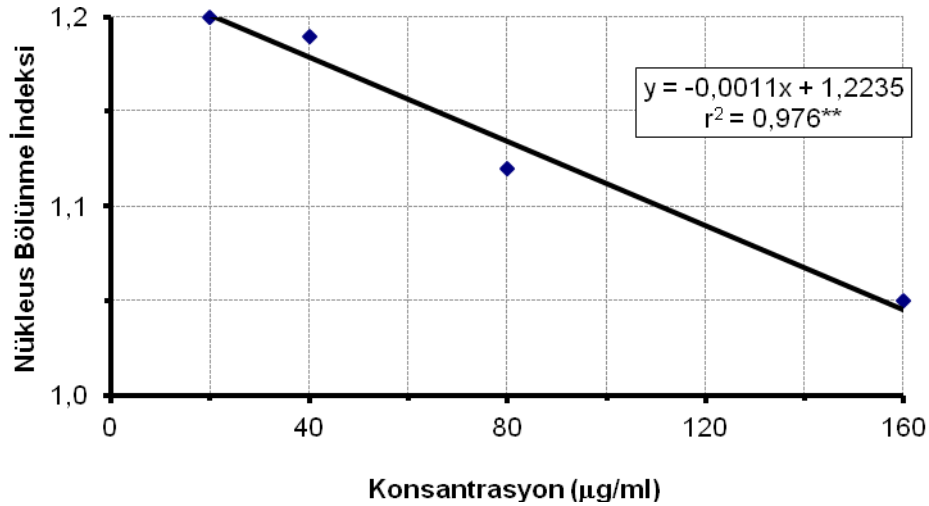
saatlik muamelenin en yüksek konsantrasyonunda (160 µg/ml) ise NBI'ni pozitif kontrolden daha fazla düşürmüştür.

NBI, 24 ve 48 saatlik muamelelerde 1-naftilasetamit konsantrasyonu arttıkça istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır (sırasıyla; $r = -0.987$, $P < 0.01$ ve $r = -0.988$, $P < 0.01$) (Şekil 4.31, Şekil 4.32).



Şekil 4.31. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde NBI'nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

** : $P \leq 0.01$



Şekil 4.32. Farklı dozlarda 1-naftilasetamit ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde NBI'nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

** : $P \leq 0.01$

González ve ark. (2011) tarafından, oksin grubuna giren sentetik bitki büyüme düzenleyicilerinden dicamba ve banvel® 'in sitokinez-blokloma MN testi ile belirledikleri NBI verilerine göre; hem dicamba hem de banvel® CHO-K1 hücrelerinde NBI'ni konsantrasyona bağlı bir şekilde düşürdüğü ancak istatistiksel olarak önemli sayılabilecek tepkinin yalnızca banvel® 'in 100-500 µg/ml'lik konsantrasyon aralığıyla muamele edilmiş kültürlerde meydana geldiği bildirilmiştir. Bu çalışmada dicamba ve banvel® NBI'ni bizim çalışmamızdaki 1-naftilasetamit gibi konsantrasyona bağlı bir şekilde düşürmüş, fakat 1-naftilasetamit daha düşük konsantrasyonlarda söz konusu etkiyi göstermiştir. Hatta bizim çalışmamızda, 1-naftilasetamit NBI'nde istatistiksel olarak önemli bir düşüşe yol açmış olup bu düşüş 48 saatlik muamelenin en yüksek konsantrasyonunda (160 µg/ml) pozitif kontrolden daha fazla olmuştur. Fakat, araştırmacılar, dicambanın NBI'nde yol açtığı düşüşün istatistiksel olarak önemsiz olduğunu sadece dicambanın ticari formu olan banvel® 'in 100-500 µg/ml'lik konsantrasyon aralığında NBI'ni istatistiksel olarak önemli bir şekilde düşürdüklerini belirtmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan 1-naftilasetamit saf halde olduğundan dolayı saf haldeki dicamba ile karşılaştırıldığında, 1-naftilasetamidin nükleus bölünmesi üzerine daha fazla olumsuz etkiler gösterdiği görülmektedir. Bu farklılık, iki maddenin kimyasal yapılarının birbirinden farklı olması, çalışmalarda kullanılan hücre tiplerinin farklı olması ya da her ikisi sentetik oksinler grubuna ait olan bu maddelerden 1-naftilasetamidin dicambaya göre daha yüksek bir sitostatik etkiye sahip olmasından dolayı da gerçekleşmiş olabilir.

Yapılan bu çalışmada, 1-naftilasetamidin test edilen tüm süre ve konsantrasyonlarda, insan periferik kan lenfositlerinde, NBI'ni kontrollere göre istatistiksel olarak önemli derecede ve konsantrasyona bağlı olarak düşürmesi test maddesinin sitostatik (hücre bölünmesini engelleyen ya da baskılayan) potansiyelini göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda, 1-naftilasetamidin her iki muamele süresi ve tüm konsantrasyonlarda MI'ni konsantrasyona bağlı bir şekilde düşürdüğü fakat bu düşüşün sadece 48 saatlik muamele süresinde kontrol ve eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede olduğu belirlenmiştir. Bu da, 1-naftilasetamidin insan periferik lenfositlerine özellikle 48 saatlik uygulamasının sitotoksik (hücreye toksik etki göstererek hücreyi öldüren) potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada 1-naftilasetamit DNA hasarını arttıarak ve böylece DNA sentezini ve hücre proliferasyonunu inhibe ederek sitotoksik/sitostatik etki göstermiş olabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, oksin grubuna dahil edilen sentetik bir bitki büyüme düzenleyicisi olan 1-naftilasetamidin insan periferal kan lenfositlerindeki genotoksik ve sitotoksik etkilerini *in vitro* KA ve MN testleri kullanarak araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, 1-naftilasetamidin 24 ve 48 saatlik süre ile insan periferal lenfositlerine muamele edildiğinde, tüm konsantrasyonlarda (20, 40, 80 ve 160 µg/ml) yapısal kromozom anormalliklerini ve MN oluşumunu; yüksek iki konsantrasyonda (80 ve 160 µg/ml) nükleer tomurcuk oluşumunu kontrollere göre önemli derecede arttırarak genotoksik etki göstermiş; aynı zamanda, test edilen tüm konsantrasyonlarda (20, 40, 80 ve 160 µg/ml), 48 saatlik muamele süresinde MI'i, her iki muamele süresinde (24 ve 48 saat) NBI'ni, kontrollere göre önemli derecede düşürerek sitotoksik/sitostatik etkiler göstermiştir. Sentetik bitki büyüme düzenleyicileri hem ülkemiz hem de dünya tarımında yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, bu gruba giren kimyasal maddelerin genotoksik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı olup, özellikle test maddemiz olan 1-naftilasetamidin genotoksik potansiyeli üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma, 1-naftilasetamidin insan periferal kan lenfositleri üzerindeki genotoksik ve sitotoksik potansiyelini gösteren ilk çalışma niteliğinde olup, söz konusu test maddesinin genotoksitesitesiyle ilgili daha kesin bilgiler elde edebilmek için bunlara ek olarak *in vivo* ve gen mutasyonlarıyla ilgili çalışmalar da yapmak gerekmektedir.

Bu çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, 1-naftilasetamidin insanlar için genotoksik ve sitotoksik riske sahip olma ihtimalinin yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Bu sebeple, mesleği gereği bitki büyüme düzenleyicilerine maruz kalma olasılığı yüksek olan tarım işçileri/üretim aşamasındaki işçiler başta olmak üzere tüm insanların bu maddelere maruziyetlerinin minimuma indirilmesi için gerekli önleyici tedbirleri alması gerekmektedir. Özellikle bu gibi maddelere doğrudan maruz kalan insanların eldiven ve maske kullanımı gibi gerekli önleyici tedbirleri almaması, genotoksik riski kaçınılmaz kılacaktır.

KAYNAKLAR

- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, 463: 11-172.
- Amer, S.M. and Aly Fawzia, A.E., 2001. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in Mouse. **Mutation Research**, 494: 1-12.
- Anderson, D., 1988. Human Biomonitoring. **Mutation Research**, 204: 353-541.
- Anonim, 2008. Proposed Re-evaluation Decision Naphthalene Acetates. ISBN: 978-1-100-11027-1 (978-1-100-11028-8), Catalogue number: H113-27/2008 28E, **The HealthCanada Pest Management Regulatory Agency**, Canada.
- Anonim, 2014a. Naphthaleneacetamide.
http://www.alanwood.net/pesticides/class_pesticides.html. Erişim tarihi: 22.04.2014.
- Anonim, 2014b. 1-Naphthaleneacetamide.
<http://www.chemicaland21.com/lifescience/agro/1-naphthalene%20acetamide.html>. Erişim tarihi: 22.04.2014.
- Armstrong, M.J., Bean, C.L., Galloway, S.M., 1992. A quantitative assessment of cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, 265: 45-60.
- Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N., Ahmad, W., 2002. Clastogenity of Pentachlorophenol, 2,4-D and Butachlor Evaluated by Allium Root Tip Test. **Mutation Research**, 514: 105-113.
- Aydoğdu, M. ve Boyraz, N., 2005. Bitki büyüme düzenleyicileri (hormon) ve hastalıklara dayanıklılık (Derleme). **Bitkisel Araştırma Dergisi**, 1: 35-40.
- Babaoğlu, M., 2002. **Bitki Büyüme Düzenleyicileri Türkiye'deki Durum ve Sağlık Açısından Değerlendirmeler**. Ders Notları, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Konya.
- Bağcı, H., Bağcı, G., Aıkbaş, İ., Demir, G., 2005. In Vitro Testing for Genotoxicity of 4-CPA by Sister Chromatid Exchange in Human Lymphocyte Culture. **Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, 35: 75-78.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S., 2001. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Reviews on Environmental Health**, 16: 1-40.
- Basra, A.S., 2000. **Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture: Their Role and Commercial Uses**. Haworth Press., ISBN 1560228911, Binghamton, NY.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Grsel, B.ř., Alvir, M., 2004. DNA hasarı analizinde μ - FADU ve Comet yntemlerinin karşılaştırılması. **Trk Klinik Biyokimya Dergisi**, 2 (3): 97-103.
- Bukowska, B., 2006. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid – Molecular Mechanisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, Vol. 15, No. 3, 365-374.
- Carrano, A.V. and Natarajan, A.T., 1988. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, 204: 379-406.

- Cenkci, S., Yıldız, M., Çiğerci, İ.H., Bozdağ, A., Terzi, H., Arıkan Terzi, E.S., 2010. Evaluation of 2,4-D and dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73: 1558-1564.
- Charles, J.M., Cunny, H.C., Wilson, R.D., Ivett, J.L., Murli, H., Bus, J.S., Gollapudi, B., 1999a. Ames assays and unscheduled DNA synthesis assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. **Mutation Research**, 444(1): 207-216.
- Charles, J.M., Cunny, H.C., Wilson, R.D., Ivett, J.L., Murli, H., Bus, J.S., Gollapudi, B., 1999b. In vivo micronucleus assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. **Mutation Research**, 444(1): 227-234.
- Choy, W.N., 2001. **Genetic toxicology and cancer risk assessment**. Copyright© 2001 by Marcel Dekker, Inc., ISBN: 0824702948, 29-187, New York.
- Clarke, A.E., Edmundson, W.C., Lombard, P.M., 1941. Seed-setting in potatoes as affected by spraying with α -naphthaleneacetamide and by light. **American Journal of Potato Research**, 18: 73-279.
- Da Silva, E.S., Wong-Wah-Chung, P., Burrows, H.D., Sarakha, M., 2013a. Photochemical degradation of the plant growth regulator 2-(1-Naphthyl) acetamide in aqueous solution upon UV irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, 89(3): 560-570.
- Da Silva, E.S., Burrows, H.D., Wong-Wah-Chung, P., Sarakha, M., 2013b. β -Cyclodextrin as a photostabilizer of the plant growth regulator 2-(1-naphthyl) acetamide in aqueous solution, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 10.1007/s10847-013-0355-5.
- Demirel, S. ve Zamani, A., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. **Genel Tıp Dergisi**, 12(3): 123-27.
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D., 1989. Identification of Aneuploidy- Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Anti-Kinetochore Antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 13: 34-43.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2-(1-naphthyl)acetamide (notified as 1-naphthylacetamide). **EFSA Journal**, 9(2): 2020, EFSA, Italy.
- EPA (Environmental Protection Agency from United States of America), 2007. Registration Eligibility Decision (RED) for Naphthaleneacetic acid, its Salts, Ester and Acetamide. **738-R-07-07017**, EPA, USA.
- Eser, B., 1986. Türkiye Örtüaltı Sebzeçiliğinde Hormon Kullanımı Olayının Değerlendirilmesi. **Türkiye Yaprak Gübreleri ve Bitki Hormonları Semineri**, 80-90, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Antalya.
- Evans, H.J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In: **Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., Handbook of Mutagenicity Test Procedures**. Elsevier Science, 405-427, Amsterdam.
- Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, 600: 58-66.
- Fenech, M. and Bonassi, S., 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, 26(1): 43-49.

- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, 26(1): 125-132.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay. **Nature Protocols**, 2(5): 1084-1104.
- Fenech, M., 2000. The in vitro Micronucleus Technique. **Mutation Research**, 455: 81-95.
- Fenech, M., 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. **Mutation Research**, 392: 11-18.
- Filkowski, J., Besplug, J., Burke, P., Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., 2003. Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic Arabidopsis thaliana plants harboring recombination and point mutation markers. **Mutation Research**, 9; 542(1-2): 23-32.
- Galloway, S.M., Miller, J.E., Armstrong, M.J., Bean, C.L., Skopek, T.R., Nichols, W.W., 1998. DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: Comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens. **Mutation Research**, 400: 169-186.
- Gardner, F.E., 1941. **Practical applications of plant growth substances in horticulture**. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 54: 20-26p, Bureau of Plant Industry, United States Department of Agriculture, America.
- Gisselsson, D., Pettersson, L., Hoglund, M., Heidenbland, M., Gorunova, L., Wiegant, J., Mertens, F., Dal Cin, P., Mitelman, F., Mandahl, M., 2000. Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97: 5357-5362.
- Giray, B., Gurbay, A., Hincal, F., 2001. Cypermethrin-induced Oxidative Stress in Rat Brain and Liver is Prevented by Vitamin E or Allopurinol. **Toxicology Letters**, 118: 139-146.
- Goodwin, T.W. and Mercer, E.I., 1983. **Introduction to plant biochemistry**. Pergamon press, ISBN 0-08-024922-1, 677p, Oxford.
- Gollapudi, B.B., Charles J.M., Linscombe, V.A., Day, S.J., Bus, J.S., 1999. Evaluation of the genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives in mammalian cell cultures. **Mutation Research**, 444: 217-225.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2006. Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells in vitro. **Toxicology in Vitro**, 20(8): 1481-7.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2007. The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel[®] induce genotoxicity and cytotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Mutation Research**, 634: 60-68.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2009. Dicamba-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. **Journal of hazardous materials**, 163: 337-343.
- González, N.V., Nikoloff, N., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2011. A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. **Toxicology letters**, 207: 204-212.

- Graf, U. and Würgler, F.E., 1996. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 27(3): 219-26.
- Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z., 1997. Pestisitler. **Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi**. İlköz Matbaası, No: 52, ISBN 975 - 8088 - 69 – 6, Ankara.
- Halloran, N. and Kasım, M.U., 2002. Meyve ve sebzelerde büyüme düzenleyici madde kullanımı ve kalıntı düzeyleri. **Gıda**, 27(5): 351-359.
- Hillard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K., Galloway, S.M., 1998. Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of non-mutagenic chemicals and metabolic poisons. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 31: 316-326.
- Holland, N.T., Duramad, P., Rothman, N., Figgs, L.W., Blair, A., Hubbard, A., Smith, M.T., 2002. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. **Mutation Research**, 521(1-2): 165–178.
- Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P., 2002. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. **Indian Journal of Pharmacology**, 34: 86-99.
- Karadeniz, A., Kaya, B., Savaş, B., Topcuoğlu, Ş.F., 2011. Effects of two plant growth regulators, indol-3-asetik asit and β -naftoksiasetik asit, on genotoxicity in *Drosophila* SMART assay and on proliferation and viability of HEK293 cells from the perspective of carcinogenesis. **Toxicology and industrial health**, 27 (9): 840-848.
- Karaman, A. ve Keskinler, F., 2009. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda genomik hasar. **Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, 29 (6): 1392-97.
- Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F.J., Speit G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells In Vitro. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 18 (1): 28-34.
- Kaya, B., Yanikoglu, A., Marcos, R., 1999. Genotoxicity Studies on the Phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* Wing Spot Test. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, 19: 305–312.
- Kaynak, L. ve Ersoy, N., 1997. Bitki büyüme düzenleyicilerinin genel özellikleri ve kullanım alanları. **Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 10: 223-236.
- Kaynak, L. ve Memiş, M., 1997. Bitki büyüme engelleyici ve geciktiricilerinin etkimekanizmaları. **Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 10: 237-248.
- Kawashima, Y., Katoh, H., Nakajima, S., Kozuka, H., Uchiyama, A., 1984. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on peroxisomal enzymes in rat liver. **Biochemical Pharmacology**, 33, 241–245.
- Korte, C., Jalal, S.M., 1982. 2,4-D induced clastogenicity and elevated rates of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. **Journal of Heredity**, 73(3): 224-6.
- Kirkland, D.J. and Müller, L., 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: The importance of thresholds. **Mutation Research**, 464: 137-147.

- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van, H.P., 1997. The in vitro micronucleus test: A multiendpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and nondisjunction. **Mutation Research**, 392(1-2): 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, 540: 153–163.
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Looock, K.V., Decordier, I., 2011. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, 85: 873-899.
- Lindberg, H., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G.C-M., Norppa, H., Fenech, M., 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research**, 617: 33-45.
- Link, H., 2000. Significance of flower and fruit thinning on fruit quality. **Plant growth Regulation**, 31, 17-26.
- Linnainmaa, K., 1984. Induction of sister chromatid exchanges by the peroxisome proliferators 2,4-D, MCPA, and clofibrate in vivo and in vitro. **Carcinogenesis**, 5(6): 703-7.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D., Ursini, M.V., 1998. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research**, 403:13-20.
- Madle, S., 1993. Problem of the harmonization of the philosophies for genotoxicity testing. **Mutation Research**, 300(2): 73-76.
- Madrigal-Bujaidar, E., Hernández-Ceruelos, A., Chamorro, G., 2001. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, 39: 941–946.
- Mansuroğlu, G.S., Sermenli, T., Kara, M., 2005. Hatay İli Sera Sebze Yetiştiriciliğinde Hormon Kullanım Durumu. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 10 (1-2): 15-30.
- Mates, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, 153, 83.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volder, M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, 88: 1515-31.
- Mavournin, H.K., Blakey, H.D., Cimino, C.M., Salamone, F.M., Heddle, A.J., 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, 239: 29-80.
- Miadoková, E., Podstavková, S., Vlcková, V., Dúhová, V., Böhmová, B., Trebatická, M., Grolmus, J., Húska, J., Vlcek, D., 1994. Genotoxicity evaluation of Rastim 30 DKV, the plant growth regulator, on five test systems. **Mutation Research**, 320(3): 181-7.
- Mladinic, M., Perkovic, P., Zeljezic, D., 2009. Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylazine and carbofuran using cytome FISH assay. **Toxicology Letters**, 189:130-137.

- Mohammed, K.B. and Ma, T.H., 1999. Tradescantia-Micronucleus And –Stamen Hair Mutation Assays On Genotoxicity of The Gaseous and Liquid Forms of Pesticides. **Mutation Research**, 19;426(2): 193-9.
- Mortelmans, K. and Rupa, S.D., 2004. Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. **Advances in Applied Microbiology**, 56: 379-401.
- Muniz, J. F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y.W., NazarStewart, V., Kisby, G.E., 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 227: 97-107.
- Mustonen, R., Kangas, J., Vuojolahti, P., Linnainmaa, K., 1986. Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations in vitro and in vivo. **Mutagenesis**, 1(4): 241-5.
- Norppa, H. and Falck, G.C-M., 2003. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, 18: 221-233.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R.J., Kunudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A., 2006. Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. **Mutation Research**, 600 (1-2): 37-45.
- Olaharski, A., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsebatt, M.E., Guzman, P., Mohar, A., Eastmond D.A., 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 27: 3317-43.
- Palavan, N., 1993. **Bitki Büyüme Maddeleri**. İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi, Yayın No: 3677, Enstitü Yayın No: 4, ISBN: 975-404-254-3, İstanbul.
- Pavlica, M., Papes, D., Nagy, B., 1991. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, 263(2): 77-81.
- Paz-Y-Miño, C., Bustamante, G., Sánchez, M.E. and Leone, P.E., 2002. Cytogenetic Monitoring in a Population Occupationally Exposed to Pesticides in Ecuador. **Environmental Health Perspectives**, 110 (11): 1077-1080.
- Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolff, S., Wassom, J.S., 1981. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program. **Mutation Research**, 87: 143–88.
- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F., Shelby, M., 1987. Mammalian in vivo cytogenetic assays: Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutation Research**, 189: 157–65.
- Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A., Westwood, F.R., 1978. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. **British Journal of Cancer**, 37: 873–959.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 1992. Regulating growth and development: The plant hormones (in: **Biology of Plants**). Worth Publishers, pp 545-571, New York, USA.
- Reddy, J.K., Rao, M.S., 1989. Oxidative DNA damage caused by persistent peroxisomeproliferation: its role in hepatocarcinogenesis. **Mutation Research**, 214, 63–68.

- Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., 1991. The Relationship Between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. **Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi**, (5), 19-24.
- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W., Speit, G., 2000. Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. **Cancer Research**, 60: 390-394.
- Sade, B., 2000. **Bitki fizyolojisi**. Selçuk Üniv. Zir. Fak. Ders Kitapları, Yayın no: 29, Konya.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W., 1992. Hormones and Growth Regulators. (in: **Plant Physiology**). Wadsworth Publishing Company, pp 382-406, California, USA.
- Salopek-Sondi, B., Piljac- Žegarac, J., Magnus, V., Kopjar, N., 2010. Free Radical-Scavenging Activity and DNA Damaging Potential of Auxins IAA and 2-Methyl-IAA Evaluated in Human Neutrophils by the Alkaline Comet Assay. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 24: 165-173.
- Savage, J.R.K., 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 22: 198- 207.
- Seçer, M., 1989. Doğal büyüme düzenleyicilerin (bitkisel hormonların) bitkilerdeki fizyolojik etkileri ve bu alanda yapılan araştırmalar. **Derim**, 6: (3), 109-124,
- Segura- Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Fernández-Gutiérrez, A., 1998. Heavy atom induced room temperature phosphorescence method for the determination of the plant growth regulator β -naphthoxyacetic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 3683-3686.
- Shrestha, G.K., 1986. Effects of growth regulators on the growth and yield of detached and transplanted potato (*Solanum tuberosum* L.) sprouts. **Potato Research**, 29, 173-175.
- Stoper, H. and Müller, O.S., 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: Amini-review. **Toxicology in Vitro**, 11: 661-67.
- Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V., 2011. Genetik Toksikite Testleri. **TÜBAV Bilim**, 4(3): 221-229.
- Thomas, T.H., 1981. **Hormonal Changes During Senescence, Ripening and Regrowth of Stored Vegetables, Quality in Stored and Processed Vegetables and Fruit**. Academic Press, pp. 253-265, London.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of Malathion in Human Lymphocytes Assessed Using the Micronucleus Assay In Vitro and In Vivo: a Study of Malathion-Exposed Workers. **Mutation Research**, 388(1): 85-95.
- Tomlin, C.D.S., 2000. **The Pesticide Manual**, 12th edn, p. 661. British Crop Protection Council Publisher, Farnham.
- Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E., 2010. **Sitogenetik**. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi, Yayın no: 99, ISBN: 978-605-395-295-4, Ankara.
- Turkula, T.E. and Jalal, S.M., 1985. Increased rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicide 2,4-D. **Journal of Heredity**, 76(3): 213-4.
- Tuschl, H. and Schwab, C., 2003. Cytotoxic Effects of the Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 41: 385-393.

- Untiedt, R. and Blanke, M., 2001. Effects of fruit thinning agents on apple tree canopy photosynthesis and dark respiration. **Plant Growth Regulation**, 35: 1-9.
- Uysal, A., Durak, Y., Aladağ, M.O., 2010. Investigation of mutagenic effects of some plant growth regulators on Salmonella/microsome test system. **Fresenius Environmental Bulletin**, 19(10): 2170-2175.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R., 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. **Mutation Research**, 244: 95-103.
- Vock, E.H., Lutz, W.K., Hormes, P., Hoffmann, H.D., Vamvakas, S., 1998. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100 and γ -irradiation. **Mutation Research**, 413: 83-94.
- Vural, N., 2005. **Toksikoloji**. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 115-129, Ankara.
- Weichmann, J., 1987. **Postharvest Physiology of Vegetables**. ISBN: 0-8247-7601-1, Marcel Dekker, Inc., 597p., New York.
- Wolff, S., 1982. Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and the lesions that produce them. In: **Wolf, S. (Ed.), Sister Chromatid Exchange**. John Wiley & Sons Inc., pp. 41-57, New York.
- Yılmaz, R. ve Yüksel, E., 2002. 2,4-D herbisitinin ileri jenerasyonlarda fare böbrek enzimleri üzerine etkisi. **Fırat Tıp Dergisi**, 7(3): 818-822.
- Young, R.R., 2002. Genetic toxicology: web resources. **Toxicology**, 173(1-2): 103-21.
- Zeiger, E., Haseman, J.K., Shelby, M.D., Margolin, B.H., Tennant, R.W., 1990. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 1: 1-14.
- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 44: 363-71.
- Zeljezic, D. ve Garaj-Vrhovac, V., 2004. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. **Toxicology**, 200: 39-47.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1985 yılında Antakya/Hatay'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini aynı ilde tamamladı. 2003 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı lisans öğreniminden 2008 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Pedagojik Formasyon öğrenimini tamamladıktan sonra aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.